



Mónica Filipa Neves Moço Alves

Licenciada em Biologia

Sistemas Bacterianos no Estudo da Bioactivação do Antirectroviral Nevirapina

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Doutor Michel Kranendonk - FCM/UNL
Co-orientador: Doutor Pedro Baptista – FCT/UNL

Júri

Presidente: Doutor José Paulo Sampaio
Arguente: Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte
Vogal: Doutor Michel Kranendonk



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Janeiro de 2013



Mónica Filipa Neves Moço Alves

Licenciada em Biologia

Sistemas Bacterianos no Estudo da Bioactivação do Antiretroviral Nevirapina

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Doutor Michel Kranendonk - FCM/UNL
Co-orientador: Doutor Pedro Baptista – FCT/UNL

Júri

Presidente: Doutor José Paulo Sampaio
Arguente: Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte
Vogal: Doutor Michel Kranendonk

Janeiro de 2013

“Sistemas Bacterianos no Estudo da Bioactivação do Antiretroviral Nevirapina” © Mónica Alves, FCT/UNL, UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa têm o direito perpétuo, e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou em forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido, ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A realização da presente dissertação marca o fim de mais uma importante etapa da minha vida, por isso, gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma importante e decisiva para a sua concretização.

Ao Professor Doutor José Rueff, Director do Departamento de Genética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, agradeço a forma terna com que fui recebida, o incentivo e a atenção revelada.

Ao Doutor Michel Kranendonk, quero expressar a minha enorme gratidão pela orientação, acompanhamento e entusiasmo revelados pelo trabalho desenvolvido. Agradeço ainda todas as críticas e sugestões apresentadas na correcção desta dissertação, assim como, a generosidade e carinho demonstrados.

Gostaria de expressar um profundo agradecimento à Dra. Carolina Almeida pela amizade, por tantos conselhos, e atenção prestada nos momentos em que tudo o que precisava parecia ser apenas uma palavra ou um gesto de conforto.

Quero também deixar um agradecimento especial ao Dr. Bruno Gomes pelo espírito de entereza, pela força transmitida, e pelos conselhos dados durante a realização do trabalho.

Agradeço ao Dr. Bernardo Brito e Palma e à Dra. Daniela Presa todo o apoio e dedicação manifestados.

Agradeço aos restantes professores, investigadores e funcionários, com quem diariamente lidei no Departamento de Genética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa pois, proporcionaram-me boa disposição e motivação pelo trabalho desenvolvido. Em especial, agradeço ao Doutor Sebastião Rodrigues e à Doutora Marta Gromicho. À Dona Lucrecia quero agradecer o afecto e auxílio, sempre que necessitei.

À Doutora Matilde Marques e à Doutora Alexandra Antunes no Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico de Lisboa, agradeço toda a disponibilidade e interesse pelo presente Projecto.

Às minhas amigas de Licenciatura da Universidade de Coimbra, em especial à Sandra Castro, agradeço o contínuo interesse demonstrado pelo meu trabalho, a atenção e o incentivo transmitido, incondicionado pela distância.

À Inês Figueiredo, à Sónia Silva, e ao Hélder Faria, agradeço profundamente o estímulo, a cumplicidade, e todo o carinho transmitido, ao longo da concretização deste Projecto.

Por último, agradeço aos meus pais e irmão, pelo apoio e pela compreensão inestimáveis, por todos os sacrifícios suportados e pelo constante encorajamento a fim da elaboração desta dissertação. Sinto-me eternamente grata por me apoiarem sempre nas minhas decisões, pelos delicados gestos de carinho e de atenção, e pela firmeza que me incitaram em aspirar triunfos.

A todos, muito obrigada.

Resumo

O antiretroviral Nevirapina (NVP) é um inibidor não nucleosídico da transcriptase reversa (INNT) aplicado contra infecções pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), cuja utilização é principalmente limitada pela hepatotoxicidade severa e erupções cutâneas associadas. Embora o mecanismo exacto da toxicidade de NVP não seja completamente conhecido, estudos prévios sugeriram que a bioactivação de NVP possa ocorrer por hidroxilação a 12-hidroxi-NVP, e subsequente sulfatação, levando à formação de electrófilos altamente reactivos.

Para estudar esta via de bioactivação, inicialmente, construiu-se uma nova estirpe teste de mutagenicidade de *Escherichia coli*, BTC2A6_SULT1A1_POR, expressando as enzimas da biotransformação humana, citocromo P450 2A6 (CYP2A6) e sulfotransferase 1A1 (SULT1A1). Contudo, utilizando o pro-mutagénio 1-metilpireno, não foi possível validar esta estirpe. Várias razões para a sua insensibilidade foram consideradas: procedimento experimental não optimizado, insensibilidade do alvo genético, e níveis limitados de PAPS, cofactor de SULT1A1. Para estudar estas hipóteses, desenvolveram-se novas estirpes teste, expressando somente SULT1A1 humana, derivadas de estirpes de Ames (*S.typhimurium* TA1535_pLCMSULT1A1 e TA1538_pLCMSULT1A1) e de *E. coli* (BTC_SULT1A1). Para verificar os níveis limitados de PAPS, construíram-se as estirpes TA1535_pLCMSULT1A1_cys e TA1538_pLCMSULT1A1_cys, as quais sobre-expressam o operão *cysDNC* bacteriano, codificante de enzimas da biossíntese de PAPS.

A optimização das condições de cultura e do procedimento do ensaio permitiram respostas mutagénicas elevadas, em particular com estirpes sobre-expressando *cysDNC*, utilizando furfuril álcool (estirpes derivadas de TA1535) e 1-hidroximetilpireno (estirpes derivadas de TA1538), pro-mutagénios bioactivados por SULT1A1.

As novas estirpes de *S. typhimurium* foram testadas com 12-hidroxi-NVP, mostrando mutagenicidade substancial, em particular a estirpe TA1538-*cysDNC*. Estes resultados sugerem que o metabolismo de NVP a 12-hidroxi-NVP, e subsequente sulfo-esterificação, seja um factor determinante na mutagenicidade de NVP, potencialmente implicado na carcinogenicidade de NVP observada em roedores. Esta via de bioactivação pode ser responsável pela reactividade de NVP com vários alvos, causando hepatotoxicidade severa e erupções cutâneas.

Palavras-chave: Nevirapina, Citocromo P450 2A6, Sulfotransferase 1A1, Bioactivação, Mutagenicidade, Teste de Ames

Abstract

Nevirapine (NVP) is a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRT) applied against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection, which use is mainly limited due to severe hepatotoxicity and adverse cutaneous events. Although the exact mechanism of NVP toxicity is not fully understood, previous studies hypothesized that metabolic bioactivation of NVP might occur through hydroxylation to 12-hydroxy-NVP, and its subsequent sulfatation, leading to the formation of highly reactive electrophiles.

To study this bioactivation route, at first, a new *Escherichia coli* mutagenicity tester strain BTC2A6_SULT1A1_POR, was constructed, expressing human biotransformation enzymes cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) and sulfotransferase 1A1 (SULT1A1). However, validation of this strain using the promutagen 1-methylpyrene was unsuccessful. Several reasons for this insensitivity were hypothesized: lack of optimized experimental procedures, the insensitivity of the genetic target and limited levels of SULT1A1's cofactor PAPS. To address these hypotheses, novel tester strains were developed expressing solely human SULT1A1, derived from Ames (*S.typhimurium* TA1535_pLCMSULT1A1 and TA1538_pLCMSULT1A1) and *E.coli* (BTC_SULT1A1) strains. To verify limited PAPS levels, strains TA1535_pLCMSULT1A1_cys and TA1538_pLCMSULT1A1_cys were constructed, which over-express the bacterial operon *cysDNC* encoding PAPS synthesis enzymes.

The optimization of culture conditions and assay-procedures yielded high mutagenicity responses, in particular with *cysDNC* overexpressing strains, for compounds such as furfuryl alcohol (TA1535 derived strains), and 1-hydroxymethylpyrene (TA1538 derived strains), two promutagens, known to be bioactivated by SULT1A1.

These novel *S. typhimurium* strains were applied to test 12-hydroxy-NVP, which demonstrated substantial mutagenicity with the TA1535- and TA1538-derived strains, in particular with the TA1538-*cysDNC* overexpressing strain. These results suggest that NVP metabolism to 12-hydroxy-NVP and subsequent sulfo-esterification to be a determining factor in NVP mutagenicity and may be implicated in the observed carcinogenicity of NVP in rodents. This bioactivation route might be responsible for NVP's reactivity with targets other than DNA, causal in severe hepatotoxicity and skin rash.

Keywords: Nevirapine, Cytochrome P450, Sulfotransferase 1A1, Bioactivation, Mutagenicity, Ames test

Índice Geral

I	Introdução	1
I.1	Biotransformação humana de xenobióticos	1
I.1.1	Sistema enzimático do citocromo P450	3
I.1.1.1	Ciclo catalítico	3
I.1.1.1.1	Dador de electrões – CYPOR	4
I.1.1.2	Nomenclatura	4
I.1.1.3	Formas humanas de CYP	5
I.1.2	Sulfotransferases	6
I.1.2.1	Actividade enzimática	6
I.1.2.1.1	Cofactor de SULT – PAPS	7
I.1.2.2	Nomenclatura	8
I.1.2.3	Formas humanas de SULT	8
I.2	Nevirapina (NVP)	10
I.2.1	Terapias antiretrovirais	10
I.2.2	Introdução de NVP na terapêutica contra HIV-1	10
I.2.3	Efeitos adversos induzidos pela NVP	10
I.2.4	Activação metabólica de NVP	11
I.2.4.1	Vias metabólicas propostas	11
I.3	Sistemas celulares para estudos de toxicidade e de mutagenicidade <i>in vitro</i>	13
I.3.1	Ensaio de mutagenicidade	13
I.3.1.1	Bactérias teste de mutagenicidade	14
I.3.1.1.1	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	14
I.3.1.1.2	<i>Escherichia coli</i> K12	15
I.3.1.2	Sistemas metabólicos	16
I.3.1.2.1	Fracção microsomal de fígado de rato	16
I.3.1.2.2	Expressão heteróloga de enzimas da biotransformação	17
I.3.1.2.2.1	Expressão heteróloga de CYPs humanos	18
I.3.1.2.2.2	Expressão heteróloga de SULTs humanas	18
I.4	Objectivo	20
II	Materiais e Métodos	21
II.1	Materiais	21
II.2	Métodos	23
II.2.1	Condições de cultura das estirpes bacterianas	23
II.2.1.1	Culturas sem indução da expressão heteróloga	24
II.2.1.2	Culturas com indução da expressão heteróloga	24

II.2.2	Cálculo das unidades formadoras de colónias	25
II.2.3	Extracção de DNA plasmídico.....	25
II.2.3.1	Análise electroforética de DNA plasmídico	25
II.2.4	Construção dos plasmídeos envolvidos no estudo	26
II.2.4.1	Construção dos plasmídeos pLCM_hSULT1A1_POR e pLCM_hSULT1A1	26
II.2.4.1.1	Amplificação e purificação do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y	26
II.2.4.1.2	Digestão enzimática do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y, e dos vectores pLCM_POR e pLCM.....	26
II.2.4.1.3	Isolamento do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y, e dos vectores pLCM_POR e pLCM	26
II.2.4.1.4	Ligação do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y aos vectores pLCM_POR e pLCM, e transformação de <i>E. coli</i> XL10-GOLD.....	27
II.2.4.1.5	Verificação da clonagem do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y nos vectores pLCM_POR e pLCM.....	27
II.2.4.2	Construção do plasmídeo pLCM_hSULT1A1_cys	27
II.2.5	Introdução de DNA plasmídico em bactérias	28
II.2.5.1	Preparação de células competentes	28
II.2.5.2	Transformação de células competentes com DNA plasmídico.....	28
II.2.5.2.1	Transformação por electroporação de estirpes LPS ^d / <i>rfa</i> ⁻	28
II.2.5.2.2	Transformação química de estirpes LPS ^d / <i>rfa</i> ⁻	29
II.2.6	Verificação das características fenotípicas das estirpes	29
II.2.6.1	Auxotrofia para L-arginina e para L-histidina	29
II.2.6.2	Presença de LPS ^d	30
II.2.7	Confirmação da sensibilidade de detecção de mutagenicidade por parte das estirpes de <i>S. typhimurium</i> e de <i>E. coli</i>	30
II.2.8	Determinação da expressão de hCYP2A6	30
II.2.9	Western blot de hSULT1A1 expresso nas diversas estirpes bacterianas	31
II.2.10	Testes de mutagenicidade em estirpes bacterianas com expressão heteróloga de enzimas humanas	31

III Resultados..... 33

III.1	Abordagem inicial sobre o desenvolvimento de uma estirpe teste de mutagenicidade competente em CYP e SULT humanos	33
III.1.1	Construção do plasmídeo pLCM_hSULT1A1_POR	33
III.1.1.1	Clonagem do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y no vector pLCM_POR.....	33
III.1.2	Desenvolvimento da estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR	34
III.1.2.1	Transformação da estirpe PD301, confirmação das características fenotípicas da estirpe, e análise da estabilidade do DNA plasmídico	34
III.1.2.2	Sensibilidade da estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR na detecção de mutagenicidade, sem expressão heteróloga de proteínas humanas	34

III.1.2.3	Análise da expressão das proteínas heterólogas CYP2A6 e SULT1A1 humanas	35
III.1.3	Ensaio de mutagenicidade com a estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR, utilizando o composto padrão 1-MP	37
III.2	Desenvolvimento de estirpes competentes em SULT1A1 humana	38
III.2.1	Construção do plasmídeo pLCM_hSULT1A1	40
III.2.2	Construção de estirpes de <i>S. typhimurium</i> e de <i>E. coli</i> competentes SULT1A1 humana	41
III.2.2.1	Transformação das estirpes TA1535, TA1538 e PD301, confirmação das características fenotípicas das estirpes, e análise do DNA plasmídico	41
III.2.2.2	Avaliação da sensibilidade das estirpes TA1535_pKKSULT1A1, TA1538_pKKSULT1A1, TA1535_pLCMSULT1A1, TA1538_pLCMSULT1A1 e BTC_SULT1A1 na detecção de mutagenicidade, sem expressão heteróloga de SULT1A1 humano	41
III.2.3	Sensibilidade na detecção de mutagenicidade de 1-HMP, dependente do tipo de mutação do alvo genético e procedimento	42
III.2.4	Ensaio de mutagenicidade com a estirpe de <i>E. coli</i> BTC_SULT1A1, utilizando 1-HMP como composto padrão	43
III.2.5	Ensaio de mutagenicidade com estirpes de <i>S. typhimurium</i> , contendo o sistema biplasmídico pCWD/pLCM_hSULT1A1	44
III.3	Desenvolvimento de estirpes competentes em SULT1A1 humana, com sobre-expressão de <i>cysDNC</i>	46
III.3.1	Construção do plasmídeo pLCM_hSULT1A1_cys	46
III.3.2	Construção da estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA1535_pLCMSULT1A1_cys e TA1538_pLCMSULT1A1_cys, competentes em SULT1A1 humana, com sobre-expressão de <i>cysDNC</i>	48
III.3.2.1	Transformação das estirpes TA1535 e TA1538, confirmação das características fenotípicas das estirpes, e análise do DNA plasmídico	48
III.3.2.2	Avaliação da sensibilidade das estirpes TA1535_pLCMSULT1A1_cys e TA1538_pLCMSULT1A1_cys na detecção de mutagenicidade, sem expressão heteróloga	48
III.3.3	Ensaio de imunodetecção de hSULT1A1 e de mutagenicidade, em função da fase de crescimento	48
III.3.4	Detecção de mutagenicidade com estirpes sobre-expressando <i>cysDNC</i>	51
III.4	Ensaio de mutagenicidade com 12-hidroxi-NVP	54

IV Discussão57

IV.1	Desenvolvimento de uma estirpe competente em CYP e SULT humanos	58
IV.2	Condições de cultura e procedimento aplicado nos ensaios de mutagenicidade	59
IV.3	Evento de reversão do alvo genético da estirpe e sensibilidade de <i>S. typhimurium</i> vs <i>E. coli</i> ..	60
IV.4	Aproximação das estirpes TA1538 e TA1535 de <i>S. typhimurium</i> ao sistema BTC	61
IV.5	Disponibilidade celular de PAPS	61
IV.6	Estudo da bioativação de 12-hidroxi-NVP	63

IV.7	Conclusão e perspectivas futuras	64
V	Bibliografia.....	67
VI	Anexos	75

Índice de Figuras

Figura I.1 - Ciclo catalítico de CYP.	4
Figura I.2 - Estabilização por ressonância de catiões originados por clivagem heterocíclica em ésteres de ácido sulfúrico derivados de (a) álcoois benzílicos e de (b) hidroxilaminas aromáticas.	7
Figura I.3 - Principais vias metabólicas da NVP, envolvendo enzimas da fase I e da fase II da biotransformação, e possíveis efeitos tóxicos desencadeados pela formação de espécies electrofílicas.	12
Figura I.4 - Via proposta para a bioactivação da NVP.	12
Figura I.5 - Contribuição de enzimas da biotransformação humanas na activação de carcinógenos.	17
Figura III.1 - Representação esquemática do plasmídeo pLCM_hSULT1A1_POR (10184 pb).	33
Figura III.2 - Electroforese em gel de agarose, dos produtos de digestão do plasmídeo pLCM_hSULT1A1_POR, presente em 6 transformantes, com a enzima de restrição <i>Eco81I</i>	34
Figura III.3 - Mutagenicidade induzida por 4-NQO (0,15 µg/placa) nos transformantes BTC2A6_SULT1A1_POR (1 - 6) e na estirpe controlo, BTC2A6_POR.	35
Figura III.4 - Espectro diferencial de hCYP2A6 das culturas dos transformantes de BTC2A6_SULT1A1_POR e da estirpe controlo, BTC2A6_POR.	36
Figura III.5 - Imunodeteção de hSULT1A1 presente nos transformantes de BTC2A6_SULT1A1_POR.	36
Figura III.6 - Diagrama sobre a estratégia de trabalho para testar as hipóteses explicativas da insensibilidade da estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR a 1-MP.	39
Figura III.7 - Representação esquemática do plasmídeo pLCM_hSULT1A1 (7093 pb).	40
Figura III.8 - Electroforese em gel de agarose, dos produtos de digestão do DNA plasmídico de 6 transformantes, com a enzima de restrição <i>Eco81I</i>	40
Figura III.9 - Curva dose-resposta do composto 1-HMP, obtida com as estirpes TA1535_pKKSULT1A1 e TA1538_pKKSULT1A1.	42
Figura III.10 - Curva dose-resposta do composto 1-HMP, obtida com a estirpe BTC_SULT1A1.	43
Figura III.11 - Curva dose-resposta do composto 1-HMP, obtida com as estirpes TA1538_SULT1A1 e TA98.	45
Figura III.12 - Curva dose-resposta de FFA, obtida com as estirpes TA1535_SULT1A1 e TA100.	45
Figura III.13 - Representação esquemática do plasmídeo pLCM_hSULT1A1_cys (10142 pb).	47
Figura III.14 - Electroforese em gel de agarose, dos produtos de digestão do DNA plasmídico, contendo o fragmento <i>cysDNC</i> , de 6 transformantes, com as enzimas de restrição <i>XbaI</i> e <i>DraI</i>	47
Figura III.15 - Actividade mutagénica de 1-HMP (5 ng/placa) obtida com a estirpe TA1538_pLCMSULT1A1, em várias fases de crescimento.	49
Figura III.16 - Actividade mutagénica de 1-HMP (5 ng/placa) obtida com a estirpe TA1538_pLCMSULT1A1_cys, em várias fases de crescimento.	49
Figura III.17 - Actividade mutagénica de FFA (5 µg/placa) obtida com a estirpe TA1535_pLCMSULT1A1, em várias fases de crescimento.	50

Figura III.18 - Actividade mutagénica de FFA (1 µg/placa) obtida com a estirpe TA1535_pLCMSULT1A1_cys, em várias fases de crescimento.	50
Figura III.19 - Curva dose-resposta do composto 1-HMP, obtida com as estirpes TA1538_pLCMSULT1A1 e TA1538_pLCMSULT1A1_cys.....	51
Figura III.20 - Curva dose-resposta do composto FFA, obtida com as estirpes TA1535_pLCMSULT1A1 e TA1535_pLCMSULT1A1_cys.....	52
Figura III.21 - Curvas dose-resposta do composto 12-OH-NVP, obtidas com as estirpes TA1535_pLCMSULT1A1, TA1535_pLCMSULT1A1_cys e TA1538_pLCMSULT1A1.	54
Figura III.22 - Curva dose-resposta do composto 12-OH-NVP, obtida com a estirpe TA1538_SULT1A1_cys.	54
Figura IV.1 - Via biossintética de cisteína em <i>S. typhimurium</i> e <i>E. coli</i>	62

Índice de Tabelas

Tabela I.1 - Vias gerais da biotransformação de xenobióticos e suas principais localizações sub-celulares.....	2
Tabela I.2 - Classificação dos CYPs humanos com base nas principais classes de substratos.	5
Tabela I.3 - Formas de SULTs humanas e sua distribuição nos tecidos.	9
Tabela I.4 - Genótipo, alvo genético, e respectivos eventos de reversão das estirpes teste TA1535, TA100, TA1538 e TA98 de <i>S. typhimurium</i>	15
Tabela I.5 - Genótipo da estirpe BTC, bem como, das suas estirpes antecessoras, e marcadores genéticos plasmídicos.	16
Tabela I.6 - Compostos bioactivados por SULTs humanos com efeitos mutagénicos já detectados em sistemas teste de mutagenicidade bacterianos.	19
Tabela II.1 - Reagentes utilizados na execução deste trabalho, e respectivos fabricantes.....	21
Tabela II.2 - Soluções utilizadas, e sua composição.	21
Tabela II.3 - Meios de cultura utilizados, e sua composição.	22
Tabela II.4 - Estirpes de <i>E. coli</i> e de <i>S. typhimurium</i> e plasmídeos utilizados no decorrente estudo. ..	22
Tabela II.5 - Plasmídeos utilizados neste estudo.	23
Tabela III.1 - Conteúdo de CYP e CYP/DO ₆₀₀ dos das culturas dos transformantes BTC2A6_SUL1A1_POR e da estirpe controlo BTC2A6_POR.	35
Tabela III.2 - Actividades mutagénicas do composto 1-HMP.	52
Tabela III.3 - Actividades mutagénicas do composto FFA.	52
Tabela III.4 - Actividades mutagénicas do composto 12-OH-NVP.....	55

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

12-OH-NVP	12-hidroxi-nevirapina
1-HMP	1-hidroximetilpireno
1-MP	1-metilpireno
4-NQO	4-nitroquinolina-1-óxido
Abs	Absorvância
<i>ada</i>	Gene envolvido no sistema indutível de reparação de DNA face a agentes alquilantes
ADP	Adenosina difosfato
AKR	Aldo-ceto redutase
Amp	Ampicilina
APS	Adenosina-3-fosfosulfato
ASH	Albumina sérica humana
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Cm	Cloranfenicol
COX	Ciclooxigenase
CYP	Citocromo P450
CYPOR	Citocromo P450 oxidoreductase
<i>cysDNC</i>	Operão <i>cysDNC</i>
D-bio	D-biotina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
ϵ	Coeficiente de absortividade molar
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina

FDA	Food and Drug Administration
FFA	Furfuril álcool
FMN	Mononucleotídeo de flavina
FMO	Flavina-monooxigenase
g	Aceleração gravítica
GST	Glutathione-S-transferase
GTP	Guanosina trifosfato
Hb	Hemoglobina
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
IFs	Inibidores de fusão
INNTRs	Inibidores não nucleosídicos de transcriptase reversa
INTRs	Inibidores nucleosídicos de transcriptase reversa
IPs	Inibidores da protease
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactósido
Kan	Sulfato de canamicina
kDa	KiloDalton
LacI ^q	Repressor de expressão
L-arg	L-arginina
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LC-MS	Cromatografia líquida- espectrometria de massa
L-his	L-histidina.HCl
LPS ^d	Parede lipopolissacarídica defectiva
M9	Meio mínimo de sais e glicose
Mr	Massa molecular relativa
MS	Espectrometria de massa
ms	milisegundo

<i>mucAB</i>	Gene plasmídico envolvido no sistema de reparação de DNA <i>error-prone</i>
NADP ⁺	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida
NAT	N-acetiltransferase
NB	Meio de cultura Nutrient broth
NMR	Ressonância magnética nuclear
NPD	4-nitro-o-fenilenediamina
NVP	Nevirapina
<i>ogt</i>	Gene envolvido na reparação de alquilação de DNA
PAPS	5'-fosfoadenosina-3'-fosfosulfato
pb	Pares de bases
POR	Gene de citocromo P450 oxidoreductase
PPi	Pirofosfato inorgânico
ptac	Promotor de expressão induzido por IPTG
rev.	Número de colónias revertentes
rpm	Rotações por minuto
S9	Fracção microsomal de fígado de rato
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Electroforese proteica em gel desnaturante de poliacrilamida
SULT	Sulfotransferases solúveis
TB	Meio de cultura Terrific broth
Thy	Tiamina
UFCs	Unidades formadoras de colónias
<i>umuDC</i>	Gene genómico envolvido no sistema de reparação de DNA <i>error-prone</i>
UV	Radiação ultravioleta
<i>uvrA</i>	Gene envolvido no sistema de reparação de DNA <i>error-free</i> em estirpes teste BTC

<i>uvrB</i>	Gene envolvido no sistema de reparação de DNA <i>error-free</i> em estirpes teste de Ames
VB	Meio de cultura Vogel-Bonner
Δ	Delecção
ΔAbs	Variação de absorvância
$\delta\text{-Ala}$	Ácido δ -aminolevulínico
$\Delta G'_0$	Energia livre de Gibbs

I Introdução

I.1 Biotransformação humana de xenobióticos

A exposição diária do Homem a uma enorme variedade de químicos estranhos ao organismo é contínua e, na maioria das vezes, inevitável e acidental. Estes compostos, designados xenobióticos, entram no organismo por via cutânea, respiratória ou pelo trato gastrointestinal e, após absorção, entram na circulação sistémica ou portal, sendo subsequentemente distribuídos pelo organismo (Guengerich, 1992). A lipofilicidade destes químicos é uma propriedade que facilita o atravessamento de membranas biológicas e, por outro lado, um obstáculo à sua eliminação, acumulando-se no organismo. Deste modo, a eliminação de compostos exógenos depende da sua conversão a químicos hidrofílicos, solúveis em água, passíveis de excreção pelos rins (na urina) e pelo fígado (na biliar), através de um processo designado biotransformação (Paulson *et al.*, 1986; Pumford e Halmes, 1997). Contudo, nem sempre a biotransformação está associada a fenómenos de destoxificação ou de bioinactivação. Nalguns casos, as reacções de biotransformação podem assumir um importante papel na bioactivação de compostos quimicamente inócuos a metabolitos reactivos, podendo induzir toxicidade (Miller e Miller, 1981).

A toxicidade de um composto químico num determinado tecido depende, por um lado, da sua predisposição em reagir com componentes celulares e, por outro, da sua concentração local. A acumulação de químicos nos tecidos é influenciada, não só pela dose e pela frequência de exposição, mas também pela forma como decorre a sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). Deste modo, a actividade toxicológica de um determinado composto é determinada pelo balanço entre diferentes factores que afectam a interacção e a concentração do químico no tecido alvo (Timbrell, 1991).

Várias drogas terapêuticas com diferentes estruturas e mecanismos de acção podem sofrer activação metabólica por enzimas da biotransformação, originando metabolitos ou intermediários reactivos, capazes de estabelecer ligações covalentes com macromoléculas celulares (Park *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005). Estas drogas incluem analgésicos, antibióticos, drogas anti-epilépticas, agentes anti-HIV, drogas cardiovasculares, entre outras (Zhou *et al.*, 2005). Para além de fármacos, muitos carcinogénicos ambientais são também susceptíveis de activação metabólica (Glatt, 2000b).

A biotransformação pode ser dividida em duas fases (tabela I.1). A fase I da biotransformação envolve reacções de hidrólise, de redução e de oxidação, responsáveis pela introdução ou exposição de um grupo funcional (-OH, -NH₂, -SH ou -COOH), aumentando a hidrofiliabilidade do xenobiótico. As reacções de conjugação da fase II, geralmente seguem a metabolização pela fase I, e envolvem transferases. Estas reacções incluem a glucoronidação, sulfatação, acetilação, metilação, conjugação com glutatona e conjugação com aminoácidos, as quais, normalmente, aumentam o potencial de excreção dos metabolitos, na urina ou na biliar (Parkinson, 2001).

As enzimas da biotransformação estão presentes na maior parte dos tecidos, no entanto, o fígado é o principal órgão de biotransformação (Vermeulen, 1996; Parkinson, 2001). Nas células

hepáticas, os componentes sub-celulares com maior nível de enzimas da biotransformação são os microsossomas do retículo endoplasmático e o citosol (Parkinson, 2001).

Tabela I.1 – Vias gerais da biotransformação de xenobióticos e suas principais localizações sub-celulares.

Reacção	Enzima	Localização
Fase I		
Oxidação	Álcool desidrogenase	Citosol
	Aldeído desidrogenase	Mitocôndria, citosol
	Aldeído oxigenase	Citosol
	Xantina oxidase	Citosol
	Monoamina oxidase	Mitocôndria
	Diamina oxidase	Citosol
	Prostaglandina H sintetase	Retículo endoplasmático
	Monooxigenases de flavina	Retículo endoplasmático
	Citocromo P450	Retículo endoplasmático
Hidrólise	Esterase	Retículo endoplasmático, citosol, lisossomas
	Peptidase	Lisossomas
	Epóxido hidrolase	Retículo endoplasmático, citosol
Redução	Azo- e nitro- redução	Microflora, retículo endoplasmático, citosol
	Redução de grupos carbonil	Citosol, retículo endoplasmático
	Redução de pontes dissulfeto	Citosol
	Redução de grupos sulfóxido	Citosol
	Redução de quinonas	Citosol
	Desalogenação redutiva	Retículo endoplasmático
Fase II		
	Conjugação com glucuronido	Retículo endoplasmático
	Conjugação com sulfato	Citosol
	Conjugação com glutathione	Citosol, retículo endoplasmático
	Conjugação com aminoácidos	Mitocôndria, retículo endoplasmático
	Acetilação	Mitocôndria, citosol
	Metilação	Citosol, retículo endoplasmático

Fonte: adaptado de Parkinson (2001).

No enquadramento deste estudo, os sistemas metabólicos citocromo P450 (enzima de biotransformação de fase I) e sulfotransferase (enzima de biotransformação de fase II) serão seguidamente discutidos em mais pormenor.

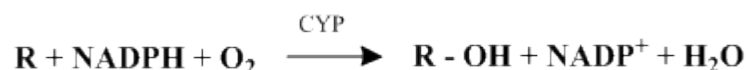
I.1.1 Sistema enzimático do citocromo P450

Mais de cinco mil citocromos P450 (CYPs) foram encontrados em múltiplos organismos, que vão desde animais e plantas, a fungos e bactérias, o que sugere uma grande diversidade em termos fisiológicos (Ingelman-Sundberg, 2004b). Apesar de não existir uma uniformidade para a distribuição de CYPs nos tecidos, estes são especialmente abundantes no fígado de mamíferos onde foram pela primeira vez descritos (Omura e Sato, 1964). Em eucariotas, os CYPs são membranares, encontrando-se ligadas ao retículo endoplasmático ou à membrana interna das mitocôndrias (Werck-Reichhart e Feyereisen, 2000).

As enzimas da superfamília CYP são uma das mais versáteis proteínas redox conhecidas, utilizando substratos endógenos e exógenos que abrangem uma grande gama de dimensões, que vai desde o etileno (Mr 28 kDa) à ciclosporina A (Mr 1201 kDa), e uma grande diversidade estrutural (Hlavica *et al.*, 2003).

I.1.1.1 Ciclo catalítico

A reacção mais comumente catalisada por CYP é a monoxidação, a qual envolve a inserção de um átomo do oxigénio num substrato orgânico (R), enquanto o outro é reduzido a água, pela reacção geral abaixo descrita (Isin e Guengerich, 2007):



O ciclo catalítico geralmente aceita para as reacções de CYPs localizados no retículo endoplasmático, encontra-se descrito na figura I.1. Sugere-se que a ligação do substrato ao local activo de CYP, para além de provocar uma alteração conformacional na enzima, permitindo a interacção da mesma com o seu parceiro redox, leva à deslocalização do solvente (H_2O), sexto ligando do ferro hémico, passando o ferro a um estado spin mais alto (Isin e Guengerich, 2007, 2008). A alteração do estado spin do Fe^{3+} aumenta o potencial redox do grupo heme, tornando favorável a transferência de um electrão do citocromo P450 oxido-redutase (CYPOR), previamente obtido de NADPH, para CYP. Consequentemente, o ferro hémico passa do estado férrico (Fe^{3+}) ao estado ferroso (Fe^{2+}) (Isin e Guengerich, 2007, 2008). Após a primeira redução, uma molécula de oxigénio liga-se rapidamente ao ião Fe^{2+} . Segue-se uma nova redução, mediada pela CYPOR (ou nalguns casos, pelo citocromo b_5), exigida pela estequiometria da reacção, sugerindo-se a formação do complexo $\text{Fe}^{2+} - \text{O}_2^-$. O O_2^- reage com dois protões do meio envolvente e quebra-se a ligação O-O. Consequentemente, liberta-se uma molécula de água e forma-se o complexo $\text{Fe} - \text{O}^{3+}$. O átomo de oxigénio ligado ao ferro é transferido para o substrato, originando um produto hidroxilado. O produto é, finalmente, libertado do sítio activo da enzima, tornando esta ao seu estado inicial (Isin e Guengerich, 2008).

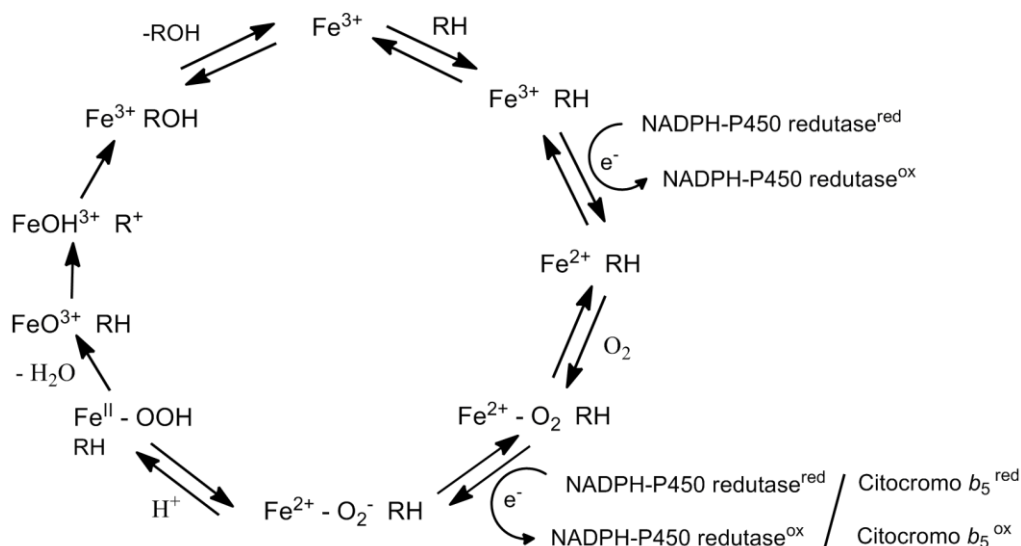


Figura I.1 - Ciclo catalítico de CYP (adaptado de Isin e Guengerich, 2008).

I.1.1.1.1 Dador de electrões – CYPOR

A proteína CYPOR é uma diflavina redutase que se encontra ligada à superfície citoplasmática do retículo endoplasmático e à membrana externa do envelope nuclear de células eucariotas (Shen e Kasper, 1993). Como se pode inferir pelo seu nome, o principal parceiro redox *in vivo* é CYP, com o qual forma o principal sistema oxidase envolvido no metabolismo de um vasto número de compostos endobióticos e xenobióticos (Montellano, 1995).

A função desta flavoproteína é transferir sequencialmente dois equivalentes redutores do NADPH para o centro hémico de CYP, via FAD e FMN. Estudos de cinética, espectroscópicos e potenciométricos, usando um sistema monooxigenase multicompetente, contendo CYPOR e uma isozima CYP, evidenciam que um hídrido é transferido do NADPH para a flavina com o potencial redox mais baixo, FAD. Esta flavina é seguidamente responsável pela transferência de electrões, um a um, para FMN, o qual reduz o centro hémico de CYP (Iyanagi *et al.*, 1974; Vermilion e Coon, 1978a, b; Iyanagi *et al.*, 1981).

I.1.1.2 Nomenclatura

Os genes da superfamília CYP estão divididos e classificados segundo as recomendações do Comité de Nomenclatura do CYP, com base na identidade de aminoácidos, critérios filogenéticos e organização dos genes (Nelson *et al.*, 1996). A classificação em famílias é indicada pelo número após o nome da superfamília (ex. CYP2), as subfamílias pela letra maiúscula após o nome da família (ex. CYP2A), e os genes individuais, pelo número após o nome da subfamília (ex. CYP2A6) (Werck-Reichhart e Feyereisen, 2000). Nesta dissertação, o prefixo h será utilizado como designação de CYP humano.

I.1.1.3 Formas humanas de CYP

Com a sequenciação completa do genoma humano, foi detectada a presença de 57 genes de CYPs humanos activos (tabela I.2) e de 58 pseudogenes (Isin e Guengerich, 2008). As formas humanas de CYP podem ser divididas em três grupos principais: 1) famílias CYP 5 – 51 de importância no metabolismo endógeno, as quais têm elevada afinidade pelos substratos e foram relativamente bem conservadas durante a evolução, 2) famílias CYP 1 – 3, normalmente com menos afinidade pelos seus substratos, menos conservadas evolutivamente, e com importantes polimorfismos genéticos e 3) família 4, importante no metabolismo de ácidos gordos e substratos relacionados, bem como, no metabolismo de alguns xenobióticos (Ingelman-Sundberg, 2004a).

Os CYPs das famílias 1 – 3 são responsáveis por 70 – 80% do metabolismo de fase I de fármacos clinicamente utilizados, e participam no metabolismo de um vasto número de xenobióticos químicos (Ingelman-Sundberg, 2004a), alterando-os de forma a atenuar a sua actividade biológica ou acelerando a sua eliminação do organismo. Por outro lado, as reacções mediadas por estas enzimas podem bioactivar químicos, convertendo-os em produtos reactivos que podem modificar constituintes celulares e originar danos que podem ter efeitos tóxicos ou carcinogénicos (Ingelman-Sundberg, 2004b).

Tabela I.2 - Classificação dos CYPs humanos com base nas principais classes de substratos. ^a

Esteróides	Xenobióticos	Ácidos gordos	Eicosanóides	Vitaminas	Desconhecido
1B1	1A1	2J2	4F2	2R1	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	24A1 ^D	2S1
7B1	2A6	4B1	4F8	26A1	2U1
8B1	2A13	4F12	5A1	26B1	2W1
11A1 ^D	2B6		8A1	27B1 ^D	3A43
11B1 ^D	2C8			26C1	4A22
11B2 ^D	2C9				4F11
17A1	2C18				4F22
19A1	2C19				4V2
21A2	2D6				4X1
27A1 ^D	2E1				4Z1
39A1	2F1				20A1
46A1	3A4				27C1
51A1	3A5				
	3A7				

^a A classificação descrita é, de certa forma, ambígua (por exemplo, CYP1B1 e CYP27A1 poderiam ser agrupados em duas diferentes categorias); ^b CYPs mitocondriais (todos os outros são encontrados no retículo endoplasmático), os quais recebem equivalentes redutores através de parceiros redox, que não CYPOR.

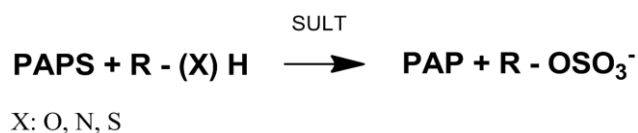
Fonte: adaptado de Guengerich and Cheng (2011).

I.1.2 Sulfotransferases

Em vertebrados existem duas classes de sulfotransferases. Uma das classes inclui principalmente formas membranares localizadas no Complexo de Golgi, responsáveis pela sulfatação de macromoléculas endógenas; a outra, abrange sulfotransferases solúveis (SULTs), normalmente citosólicas, metabolizadoras de pequenos compostos endógenos (como hormonas e neurotransmissores) e numerosos xenobióticos (Glatt *et al.*, 2000; Glatt e Meini, 2004).

I.1.2.1 Actividade enzimática

As SULTs são enzimas da biotransformação da fase II responsáveis pela transferência de um grupo sulfato do cofactor 5'-fosfoadenosina-3'-fosfosulfato (PAPS) para regiões nucleofílicas dos seus substratos (em particular, para grupos hidroxilo, amino e tiol) (Meini *et al.*, 2002; Glatt e Meini, 2004), gerando grupos sulfato, sulfamato e tiosulfato:



Por conseguinte, a solubilidade em água das moléculas receptoras aumenta, e a penetração passiva através das membranas celulares é dificultada, evitando a reabsorção. Estas propriedades facilitam a excreção urinária e biliar (Meini *et al.*, 2002).

A sulfonação é um passo final comum na biotransformação de xenobióticos e está normalmente associada à inactivação (Glatt, 1997). No entanto, por transferência enzimática do grupo sulfato do cofactor PAPS para um átomo de oxigénio do substrato (O-sulfonação), podem formar-se ésteres de ácido sulfúrico. O átomo de oxigénio pode estar presente nos compostos absorvidos ou ser introduzido por reacções de biotransformação da fase I, nomeadamente por hidroxilação (Glatt, 2000a). Dado que o grupo sulfato é um grupo captador de electrões, este pode ser clivado heterociclicamente, levando à formação de um catião electrófilico de vida curta (Glatt, 1997; Glatt, 2000b), capaz de reagir com nucleófilos celulares, e num caso último, com o DNA, introduzindo mutações (Meini *et al.*, 2002; Glatt e Meini, 2004), representando uma via metabólica de bioactivação.

A clivagem do grupo sulfato é facilitada se o catião resultante for estabilizado por mesomerismo, como é o caso de ésteres de ácido sulfúrico derivados de álcoois benzílicos e de hidroxilaminas aromáticas (Wiseman *et al.*, 1985; Miller, 1994) (figura I.2).

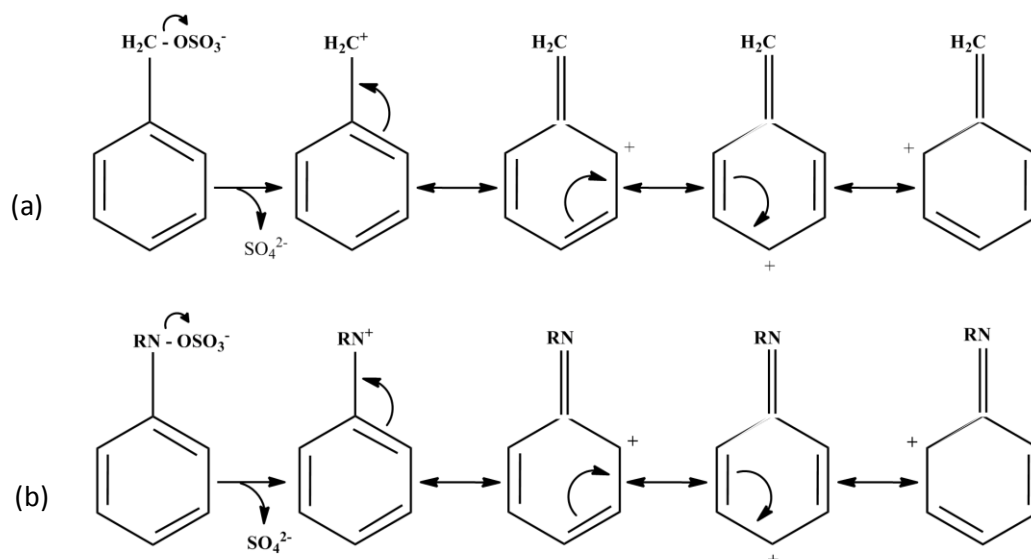
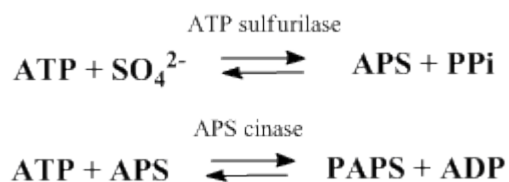


Figura I.2 – Estabilização por ressonância de catiões originados por clivagem heterocíclica em ésteres de ácido sulfúrico derivados de (a) álcoois benzílicos e de (b) hidroxilaminas aromáticas (adaptado de Glatt, 1997).

A bioactivação de xenobióticos por SULTs difere de outras vias de activação na sua natureza cíclica pois, muitos ésteres de ácido sulfúrico, ao reagirem com água, são hidrolisados espontaneamente. Consequentemente, o composto hidroxilado é regenerado, tornando-se disponível para um novo ciclo de activação (Glatt, 2000b).

I.1.2.1.1 Cofactor de SULT – PAPS

O PAPS é a fonte do grupo sulfato em reacções de sulfonação e também cofactor obrigatório de sulfotransferases citosólicas e membranares. A sua síntese é feita através de uma reacção de dois passos. O primeiro passo combina ATP e sulfato inorgânico (SO_4^{2-}) para formar adenosina-3-fosfosulfato (APS) e pirofosfato (PPi), reacção catalisada pela ATP sulfurilase; no passo seguinte, APS cinase combina a APS com o ATP, originando PAPS e ADP:



As moléculas APS e PAPS são as formas conhecidas de sulfato activado, as quais contêm uma ligação anidrido de ácido sulfúrico-fosfórico. A elevada energia de hidrólise desta ligação, $\Delta G'_0 = -19$ kcal/mol, potencia a transferência do grupo $-\text{SO}_3$, para os seus subsequentes destinos metabólicos.

As enzimas ATP sulfurilase e APS cinase são essenciais para a assimilação de sulfato em muitos organismos (Siegel, 1975). Em *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* as reacções

mediadas pelas referidas enzimas ocorrem no início do braço redutivo da via biossintética de cisteína (Kreditch, 1987). Bactérias litotróficas acoplam a oxidação de metabolitos de sulfato reduzido à síntese de ATP, por fosforilação oxidativa (Siegel, 1975). Em mamíferos, o sulfato activado é fundamentalmente utilizado em reacções de sulfonação (Mulder e Scholtens, 1978)

Foi demonstrado que a reacção catalisada pela ATP sulfurilase é energeticamente desfavorável (Robbins e Lipmann, 1958). No entanto, a hidrólise do pirofosfato, formado na primeira reacção, e a rápida utilização de APS, na segunda, liberta energia que suporta toda a reacção, permitindo a acumulação de PAPS (Siegel, 1975).

Vários estudos sugerem que a sulfonação em organismos complexos é restrita à presença de PAPS pois, 1) a sulfonação não ocorre na ausência de PAPS *in vitro* ou sob condições que limitam a sua síntese, 2) o possível sítio de ligação de PAPS nas sulfotransferases é conservado entre diferentes isoformas, entre diferentes tecidos e entre diferentes espécies (Komatsu *et al.*, 1994; Chiba *et al.*, 1995) e 3) análogos estruturais de PAPS ligam-se e inibem sulfotransferases (Rens Domiano e Roth, 1987).

I.1.2.2 Nomenclatura

Todas as SULTs estudadas até ao momento são membros de uma única superfamília de genes de enzimas (SULT) (Glatt e Meinel, 2004), classificadas de acordo com o grau de similaridade na sequência de nucleótidos dos seus genes ou cDNA (Glatt *et al.*, 2000). Uma nomenclatura sistemática semelhante à de CYP tem sido proposta para formas individuais de SULT, mas ainda não está formalizada. No entanto, este sistema é já amplamente aplicado em formas de SULT humanas (Glatt e Meinel, 2004). A classificação em famílias é indicada pelo número após o nome da superfamília (ex. SULT2), as subfamílias, pela letra maiúscula após o nome da família (ex. SULT2B), os genes individuais, pelo número após o nome da subfamília (ex. SULT2B1), e diferentes formas resultantes de *splicing* alternativo, pela letra minúscula seguida ao nome da subfamília (ex. SULT2B1a) (Glatt, 2000a). Esta nomenclatura será a utilizada na presente dissertação, correspondendo o prefixo h à designação de SULTs humanas.

I.1.2.3 Formas humanas de SULT

Em humanos, são conhecidos 10 genes pertencentes à superfamília SULT, um dos quais codifica duas formas desta proteína por *splicing* alternativo (tabela I.3). As restantes formas são codificadas por genes individuais (Glatt *et al.*, 2000).

Actualmente, apenas três formas de SULTs foram estudadas por purificação proteica: SULT1A1, SULT1A3 e SULT2A1. Estas formas estão relativamente bem caracterizadas no que respeita à especificidade pelo substrato, distribuição nos tecidos, termoestabilidade e interacção com inibidores. As outras oito formas foram detectadas por clonagem de cDNA. As formas SULT1C1, SULT1C2, SULT2B1a, SULT2B1b e SULT4A1 são as menos estudadas (Glatt, 2000a; Glatt *et al.*,

2001), sabendo-se muito pouco quando às suas propriedades enzimáticas, regulação e distribuição nos tecidos.

As enzimas SULT1A1, SULT1A2 e SULT1A3 são codificadas por um *cluster* de genes localizado no cromossoma 16 (16p12.1-11.2), e diferem na sua especificidade pelo substrato e distribuição nos tecidos. A SULT1A1 é a forma predominante de SULT1A no fígado, mas é também encontrada em muitos outros tecidos extra-hepáticos; a SULT1A3 apresenta uma expressão negligível no fígado, mas alta no intestino, cérebro e rins, sendo também encontrada nas plaquetas; e, SULT1A2 foi, até hoje, apenas descrita no fígado, por detecção de mRNA (Glatt *et al.*, 2001; Nowell e Falany, 2006).

Tabela I.3 - Formas de SULTs humanas e sua distribuição nos tecidos.

Forma de SULT	Tecidos ^a
1A1	Elevada expressão no fígado; plaquetas; placenta; glândula adrenal; endométrio; cólon; jejuno; cérebro; leucócitos
1A2	Fígado (RNA); alguns tumores da bexiga
1A3	Elevada expressão no jejuno e no cólon; plaquetas; placenta; cérebro; leucócitos; expressão negligível no fígado
1B1	Elevada expressão observada no cólon; fígado; intestino delgado; leucócitos
1C1	Rins (RNA); estômago (RNA); glândula da tireóide (RNA); fígado fetal (RNA)
1C2	Pulmão fetal (RNA); rim fetal (RNA); coração fetal (RNA); rins (RNA); ovários (RNA); espinal medula (RNA)
1E1	Fígado; endométrio; jejuno; células epiteliais mamárias sem culturas primárias; glândula adrenal (RNA); fígado (RNA); intestino delgado (RNA); rim fetal (RNA); pulmão fetal (RNA); fígado fetal (RNA)
2A1	Fígado; glândula adrenal; jejuno
2B1a, 2B1b	Placenta (RNA); próstata (RNA); traqueia (RNA)
4A1	Cérebro

^a Proteína ou actividade enzimática característica (a menos que seja especificado o contrário) em tecidos adultos (a menos que seja especificado o contrário).

Fonte: adaptado de Glatt *et al.* (2001).

I.2 Nevirapina (NVP)

I.2.1 Terapias antiretrovirais

Durante as passadas três décadas, várias terapias anti-HIV-1 têm sido desenvolvidas. Os primordiais regimes de tratamento monoterapêutico progrediram para terapias antiretrovirais altamente activas (*highly active antiretroviral therapy*, HAART), actualmente utilizadas, que incluem a combinação de várias drogas antiretrovirais, tipicamente três ou quatro. Embora esta estratégia seja essencial para atrasar significativamente a progressão do vírus HIV-1, e reduzir a viremia no plasma para níveis muito baixos, a rápida emergência de resistência do vírus às terapias, e os efeitos colaterais severos de vários fármacos, têm limitado a eficácia destas terapias (Pani *et al.*, 2002).

A terapia antiretroviral normalmente utilizada baseia-se na combinação de drogas com diferentes mecanismos de acção, que podem ser classificadas em três grupos, consoante o passo da replicação do vírus que afectam (Pani *et al.*, 2002; Hartman e Buckheit, 2012):

- Inibidores de fusão (IFs) evitam a entrada do vírus HIV-1 nas células, bloqueando a fusão da membrana externa do vírus com a membrana celular ou impedindo a ligação do vírus a receptores da célula hospedeira (Ryser e Fluckiger, 2005);
- Inibidores da transcriptase reversa, nucleosídicos (INTRs) e não nucleosídicos (INNTRs), impedem a conversão do RNA do vírus a DNA, actuando como falsos substratos (De Clercq, 1992);
- Inibidores da protease (IPs), inviabilizam a acção desta enzima viral, necessária no processamento de poliproteínas importantes na formação de partículas maduras extracelulares infecciosas (Molla *et al.*, 1998).

I.2.2 Introdução de NVP na terapêutica contra HIV-1

A Nevirapina (11-ciclopropil-5,11-dihidro-4-metil-6*H*-dipirido [3,2-*b*:2',3'-*e*] [1,4] diazepina-6-um, Viramune, NVP) foi o primeiro inibidor não nucleosídico da transcriptase reversa (INNTR) aprovado pela U.S. Food and Drug Administration (FDA, 1996) tanto para uso em terapia combinada contra infecções pelo vírus HIV-1, como para prevenção da transmissão do mesmo por via materna, particularmente, em países em vias de desenvolvimento (Marseille *et al.*, 1999). A maioria dos programas de tratamento anti-retroviral usa a NVP como regime de primeira linha, não só pela sua eficácia, mas também por ser de uso adequado durante a gravidez (Marseille *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2003; Lockman *et al.*, 2007).

I.2.3 Efeitos adversos induzidos pela NVP

Apesar da eficácia clínica da NVP, a administração deste fármaco está associada a uma variedade de respostas adversas, cuja susceptibilidade difere entre pacientes. Os efeitos adversos

mais comuns são, erupções cutâneas, que podem eventualmente conduzir à descontinuação da toma do fármaco, e a mais grave, hepatotoxicidade severa, fatal nalgumas circunstâncias (Pollard e Malim, 1998). Por este motivo, a NVP encontra-se actualmente listada no quadro de ameaça para hepatotoxicidade, pela FDA (FDA, 2000).

I.2.4 Activação metabólica de NVP

As razões dos efeitos adversos da administração da NVP não estão bem claras, no entanto, são cada vez mais as evidências que apontam para que a activação metabólica do fármaco a electrófilos reactivos seja a causa. Estes produtos podem ligar-se covalentemente a proteínas e a outras macromoléculas (incluindo o DNA), desencadeando eventos críticos na iniciação de toxicidade (Guengerich e MacDonald, 2007).

I.2.4.1 Vias metabólicas propostas

Em todas as espécies de mamíferos investigadas, incluindo humanos, o metabolismo da NVP envolve uma hidroxilação mediada por CYP. Os CYPs humanos (2A6, 2B6, 2C9, 2D6 e 3A4) levam à formação dos produtos estáveis 2-, 3-, 8- e 12-hidroxi-NVP (Pollard *et al.*, 1998; Marseille *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2003; Lockman *et al.*, 2007); tipicamente, estes metabolitos sofrem uma subsequente glucoronidação e são excretados pela urina. Porém, outras reacções de fase II não são excluídas, as quais podem gerar metabolitos electrofílicos capazes de reagir com moléculas nucleofílicas e iniciar eventos tóxicos (Silverman, 2004).

Estudos conduzidos por Chen *et al.* (2008) permitiram detectar 12-sulfoxi-NVP por LC-MS em amostras de urina e biliar de rato Brown Norway, aos quais foi administrado NVP (Chen *et al.*, 2008). A presença de 12-sulfoxi-NVP sugeriu uma possível sulfatação de 12-hidroxi-NVP *in vivo*. Pensa-se que esta sulfatação origine um *leaving group* que ao dissociar-se, forme o intermediário reactivo quinona-metídeo de NVP, capaz de reagir com grupos nucleofílicos de proteínas e DNA, formando ligações covalentes (Chen *et al.*, 2008).

Múltiplos adutos já foram caracterizados *in vitro* por Antunes *et al.* (2008) com DNA, utilizando 12-mesiloxi-NVP como molécula modelo de 12-sulfoxi-NVP. Utilizando a mesma molécula modelo, algumas ligações com albumina de soro humano (ASH) e com hemoglobina (Hb) humana, foram também caracterizadas pelo mesmo grupo (Antunes *et al.*, 2010b). Estudos realizados com doentes infectados com HIV-1 sob terapia combinada, incluindo NVP, mostraram a formação de adutos entre derivados reactivos de 12-hidroxi-NVP e a valina presente na extremidade N-terminal da hemoglobina (Caixas *et al.*, 2012).

Assim, postula-se que a via metabólica envolvida na bioactivação de NVP seja a formação de 12-hidroxi-NVP, por acção de várias formas de CYPs, o qual sofre uma subsequente sulfatação. Na figura I.3, descrevem-se as principais vias metabólicas envolvidas no metabolismo de NVP e, na figura I.4, esquematiza-se a via proposta para a sua bioactivação a electrófilos reactivos.

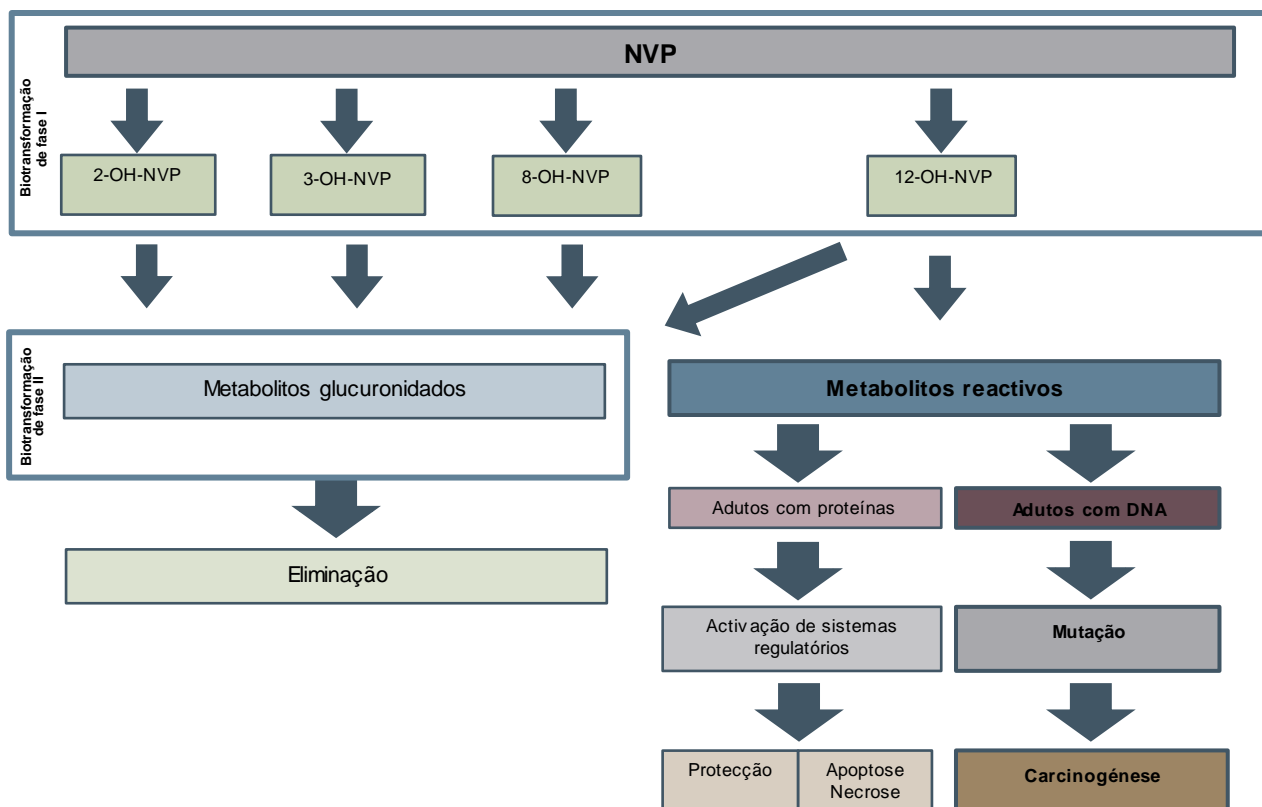


Figura I.3 – Principais vias metabólicas da NVP, envolvendo enzimas da fase I e da fase II da biotransformação, e possíveis efeitos tóxicos desencadeados pela formação de espécies electrofílicas (adaptado de Caixas *et al.*, 2012).

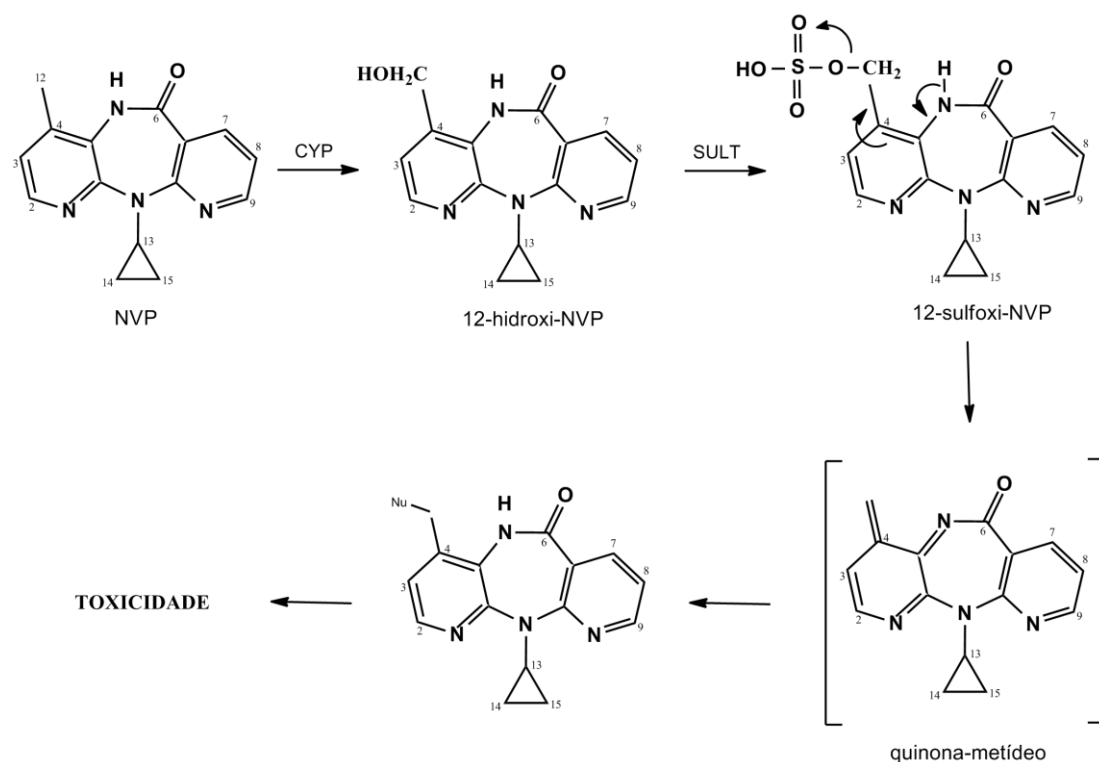


Figura I.4- Via proposta para a bioativação da NVP (adaptado de Wen *et al.*, 2009).

Testes *in vitro* convencionais, incluindo testes de mutagenicidade (bacterianos e em células de mamíferos) e ensaios citogenéticos, não demonstraram a mutagenicidade nem a clastogenicidade de NVP. No entanto, estudos *in vivo* mostraram o possível desenvolvimento de hepatoneoplasias em roedores tratados com NVP (Anonymous, 2009). Em humanos sugere-se uma tendência para o aparecimento de tumores não relacionados com infecções por HIV-1, predominantemente o linfoma de Hodgkin em doentes sob terapia antiretroviral combinada, onde NVP é utilizado como fármaco de primeira linha (Powles *et al.*, 2009). Adicionalmente, reacções severas na pele associadas a terapias com NVP e 12-hidroxi-NVP têm sido modeladas em animais experimentais por Chen *et al.* (2008).

I.3 Sistemas celulares para estudos de toxicidade e de mutagenicidade *in vitro*

Todos os anos, centenas de compostos são sintetizados e necessariamente testados, podendo o custo de animais-teste exceder vários milhões de euros para testar uma simples substância. Para além disso, a protecção, o bem-estar e o uso responsável de animais para fins científicos são abrangidos por legislação tomada pela UE, que tem por base o princípio dos três R: substituir (*replace*), reduzir (*reduce*) e aperfeiçoar (*refine*) estes modelos experimentais (EC, 2012). Por este motivo, tem-se tornado extremamente importante desenvolver sistemas *in vitro* fidedignos para avaliar a toxicidade química de vários compostos.

Estudos *in vitro* permitem obter informação relacionada com os mecanismos bioquímicos de toxicidade ou de mutagenicidade induzidos por químicos (Davila *et al.*, 1998; Kranendonk *et al.*, 2000), o que *in vivo* é praticamente inviável, devido à heterogeneidade estrutural e funcional dos animais de laboratório (Davila *et al.*, 1998). O baixo custo e a obtenção de resultados a curto prazo são outras das vantagens deste tipo de testes (Omary, 2004).

I.3.1 Ensaios de mutagenicidade

Existem vários sistemas teste *in vitro* descritos para estudos de genotoxicidade, sendo os de uso mais generalizado, bactérias, leveduras, e culturas de células de mamíferos. Entre os sistemas celulares referidos, o uso de bactérias para detecção de mutagénios químicos é o mais utilizado e o melhor validado (Kranendonk *et al.*, 2000).

Durante mais de quatro décadas, sistemas teste de mutagenicidade bacterianos têm sido utilizados, não só como método de rastreio sobre a genotoxicidade de químicos e riscos associados à sua exposição, mas também para inferir sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos na mutagenicidade (Kranendonk *et al.*, 2000).

A utilização rotineira das bactérias em ensaios de mutagenicidade está associada ao baixo custo, ao alto rendimento, ao uso simplificado e à facilidade com que estes sistemas celulares são manipulados geneticamente (Kranendonk *et al.*, 2000). Para além disso, a *performance* destes sistemas pode ser progressivamente melhorada devido a avanços na engenharia genética bacteriana

e à compreensão da base molecular da mutagenicidade induzida por químicos específicos (Kranendonk *et al.*, 1999b).

I.3.1.1 Bactérias teste de mutagenicidade

Na maioria dos ensaios de mutagenicidade bacterianos utilizam-se estirpes de *S. typhimurium* e de *E. coli*, as quais apresentam um conjunto de características específicas com importância na sensibilidade de detecção de mutagenicidade (Kranendonk *et al.*, 1999b; Kranendonk *et al.*, 2000).

I.3.1.1.1 *Salmonella typhimurium* LT2

O teste de Ames é um ensaio de curto termo amplamente aceite para identificação de substâncias que, ao induzirem lesões no DNA de estirpes teste de *S. typhimurium*, originam mutações. Cada estirpe teste de *S. typhimurium* contém um diferente tipo de mutação no operão histidina (alvo genético), que as incapacita de sintetizar este aminoácido. Consequentemente, estas bactérias são incapazes de crescer na sua ausência (auxotrofia para a histidina). Contudo, a incidência de novas mutações neste operão, pode restaurar a biossíntese de histidina (reversão do alvo genético) e permitir o crescimento de bactérias na ausência deste aminoácido (prototrofia para a histidina) (Maron e Ames, 1983), possibilitando a sua detecção em meios selectivos.

Para além de auxotróficas para histidina, as estirpes teste de *S. typhimurium* de Ames TA1535, TA1538, TA100 e TA98 apresentam um conjunto de características específicas que as tornam mais sensíveis na detecção de mutagénios químicos, nomeadamente, a deleção do gene *uvrB*, responsável pela inactivação do mecanismo de reparação por excisão de bases; e, a mutação *rfa*⁻, levando à formação de uma parede lipopolissacarídica defectiva (LPS^d), que torna a parede celular da bactéria mais permeável a químicos de maiores dimensões, como é o caso de compostos aromáticos policíclicos (Ames *et al.*, 1973; Mortelmans e Zeiger, 2000). Adicionalmente, o plasmídeo pKM101, presente nas estirpes TA100 e TA98 (Ames *et al.*, 1975), aumenta a mutagénese química e espontânea por activação do sistema de reparação de DNA *error-prone* (McCann *et al.*, 1975; Shanabruch e Walker, 1980)

Na tabela I.4 encontram-se especificados o genótipo, alvo genético e respectivos eventos de reversão das estirpes TA1535, TA100, TA1538 e TA98, de *S. typhimurium*, incluídas no presente estudo (Maron e Ames, 1983; Mortelmans e Zeiger, 2000).

Tabela I.4 - Genótipo, alvo genético, e respectivos eventos de reversão das estirpes teste TA1535, TA100, TA1538 e TA98 de *S. typhimurium*.

Estirpe	Mutação (sequência alvo) Evento de reversão	Genótipo		
		<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM101
TA1535	<i>hisG46</i> (GGG/CCC) Substituição de bases	-	-	-
TA100				+
TA1538	<i>hisD3052</i> (-C-G-C-G-C-G-C-G-) Frameshift	-	-	-
TA98				+

Fonte: adaptado de Mortelmans and Zeiger (2000).

I.3.1.1.2 *Escherichia coli* K12

Apesar das estirpes teste de mutagenicidade de *S. typhimurium*, desenvolvidas por Ames, serem as mais frequentemente utilizadas em ensaios de mutagenicidade bacterianos, e as melhor caracterizadas (Maron e Ames, 1983; Mortelmans e Zeiger, 2000) e validadas como estirpes teste, parecem ser menos sensíveis a danos no DNA quando comparadas com *E. coli* (Kranendonk *et al.*, 1994). Para além disso, a resposta SOS de *E. coli* é melhor compreendida, o que torna estas estirpes mais apropriadas para estudos mecanísticos de mutagénese e compreensão do papel da reparação do DNA (Kranendonk *et al.*, 2000).

A resposta SOS é um sistema de reparação de DNA, conhecido em *E. coli* e noutras bactérias, que pode ser activado devido a danos contínuos no DNA. Quando a resposta SOS é activada, a taxa de mutações no DNA pode aumentar por indução do sistema de reparação mutagénico *error-prone*, dependente do operão cromossomal *umuDC* (Janion, 2008).

A estirpe teste BTC de *E. coli*, utilizada no decorrente estudo, desenvolvida pelo Doutor Kranendonk e colaboradores, apresenta um alvo genético (*argE3*) que pode ser monitorizado em testes de mutagenicidade pela reversão da auxotrofia para a arginina, através de mutações por substituição de bases (Duarte *et al.*, 2005). Esta estirpe apresenta também 1) a mutação LPS^d, responsável pelo aumento da sensibilidade da estirpe a mutagénios de maiores dimensões, cuja permeabilidade seria limitada na célula *wild-type* (Kranendonk *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2005); 2) uma mutação no gene *uvrA*, resultando numa capacidade diminuída da reconstituição do DNA mutado à forma original, através do sistema de reparação de DNA *error-free*; 3) um sistema de reparação *error-prone* aumentado (mediado pelos produtos dos genes plasmídicos, *mucAB*), capaz de introduzir mutações com alta frequência, designado *SOS mutagenesis*; e, 4) inactivação dos genes *ada* e *ogt*, responsáveis pela codificação de duas enzimas de reparação alquil-DNA muito eficientes, aumentando a sensibilidade da estirpe na detecção de agentes alquilantes de DNA (Duarte *et al.*, 2005). Na tabela I.5 encontram-se listadas as características genotípicas referidas, e os marcadores genéticos plasmídicos mais relevantes.

Tabela I.5 - Genótipo da estirpe BTC, bem como, das suas estirpes antecessoras, e marcadores genéticos plasmídicos.

Estirpes	Genótipo
AB1157	<i>thr-1, ara-14, leuB6, Δ(gpt-proA)62, lacY1, tsx-33, qsr, supE44, galK2, λ⁻, rac⁻ hisG4, rfbD1, mgl-51, rpsL31, kdgK51, xyl-5, mtl-1, argE3, thi-1</i>
FP400	AB1157, <i>uvrA6, galE, his⁺, pro⁺, leu⁺, thr⁺</i>
PD100	FP400, <i>ada10::Tn10</i>
PD200	PD100, <i>ada10</i> [Tet ^s]
PD300	PD200, <i>Δogt::cm^r</i>
PD301	PD300, LPS ^d
BTC	PD301/ pLCM_POR/ pCWA

Plasmídeos	Marcadores genéticos relevantes
pLCM	<i>mucAB⁺, Kan^r</i> , derivado de pACYC177
pCWA	Vector de expressão em <i>E. coli</i> , Amp ^r , ptac.ptac/LacI ^d

Fonte: adaptado de Duarte *et al.*, 2005.

I.3.1.2 Sistemas metabólicos

I.3.1.2.1 Fracção microsomal de fígado de rato

O reconhecimento da importância da biotransformação de xenobióticos na mutagenicidade de muitos compostos (Miller e Miller, 1981) (figura I.5) e o facto da maioria dos sistemas teste convencionais não serem metabolicamente competentes (bactérias e leveduras), ou terem perdido essa capacidade (linhas celulares de mamífero) (Kranendonk *et al.*, 1998; Duarte *et al.*, 2005), incentivou a optimização dos ensaios de genotoxicidade comuns até então. Para aumentar a performance dos testes de mutagenicidade, passou a generalizar-se o uso de sistemas metabólicos exógenos, normalmente fracção microsomal S9 de fígado de rato (Hakura *et al.*, 1999).

A incorporação de fracção microsomal S9 de fígado de rato como sistema metabólico exógeno em testes de mutagenicidade, foi uma característica chave para o sucesso dos testes *in vitro* de mutagenicidade, em particular do teste de Ames. No entanto, apresenta algumas limitações (Kranendonk *et al.*, 2000):

- A activação metabólica dos compostos-teste ocorre externamente, originando metabolitos reactivos com características moleculares que dificultam a sua entrada, e consequente interacção com o alvo genético;
- Não representam os padrões metabólicos humanos;
- A presença de múltiplas enzimas dificulta a determinação da contribuição de enzimas individuais e a compreensão das vias metabólicas envolvidas na bioactivação do composto;
- Não reflectem a biotransformação de xenobióticos noutros órgãos, para além do fígado.

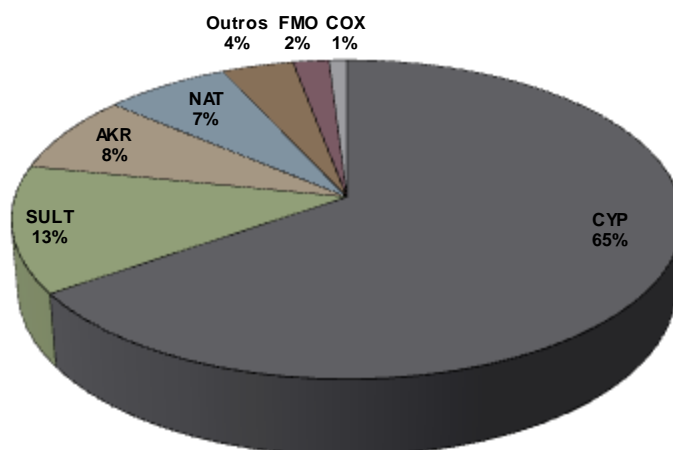


Figura I.5 – Contribuição de enzimas da biotransformação humanas na activação de carcinógenos. CYP, citocromo P450; SULT, sulfotransferase; AKR, aldo-ceto redutase; NAT, N-acetil transferase; FMO, flavina-monooxygenase; COX, ciclooxigenase (adaptado de Rendic e Guengerich, 2012).

I.3.1.2.2 Expressão heteróloga de enzimas da biotransformação

Para ultrapassar as deficiências dos sistemas metabólicos exógenos, novos sistemas celulares para testes *in vitro*, metabolicamente competentes, têm sido desenvolvidos, recorrendo à tecnologia do DNA recombinante. Estes sistemas metabólicos competentes são obtidos por clonagem de cDNA de enzimas da biotransformação em vectores de expressão eficientes (Guengerich *et al.*, 1996). A expressão heteróloga de enzimas da biotransformação em sistemas teste de mutagenicidade tem como principais vantagens: possibilitar o estudo do papel de enzimas específicas na bioactivação de um determinado composto, possibilitar o uso de proteínas recombinantes humanas, e permitir um metabolismo intracelular (próximo do DNA), aumentando a sensibilidade na detecção de mutagénios.

Actualmente, já foram expressas quatro famílias de enzimas da biotransformação, nomeadamente, glutathione-S-transferases (GSTs), N-acetil-transferases (NATs), citocromos P450 (CYPs) e sulfotransferases (SULTs) em sistemas teste de mutagenicidade bacterianos.

Estirpes laboratoriais de *E.coli* foram o sistema mais utilizado para expressão heteróloga de enzimas da biotransformação humanas, não só devido aos elevados níveis de expressão proteica e elevadas densidades celulares que atingem, mas também por serem facilmente manipuláveis. Contudo, estas estirpes foram essencialmente optimizadas para produção e purificação de proteínas em larga escala, sendo pouco efectivas como sistemas teste de mutagenicidade. Por este motivo, a introdução de vectores de expressão adequados e a optimização das condições de crescimento foram factores fulcrais no desenvolvimento de estirpes teste de mutagenicidade de *E.coli*, competentes em enzimas da biotransformação (Friedberg *et al.*, 1999; Kranendonk *et al.*, 2000).

I.3.1.2.2.1 Expressão heteróloga de CYPs humanos

A estirpe BTC de *E. coli*, utilizada neste estudo, foi desenvolvida para co-expressão de CYP e de CYPOR, codificados em dois vectores de expressão, abaixo mencionados:

- Plasmídeo pCW_CYP, vector de expressão *medium-high copy number*, contendo cDNA de CYPs humanos, localizado a *downstream* do promotor ptac.ptac, regulado pelo repressor LacI^q;
- Plasmídeo pLCM_POR, vector de expressão *low copy number*, contendo o operão *mucAB* e cDNA de CYPOR humano, localizado a *downstream* do promotor ptac, regulado pelo repressor LacI^q.

Esta estirpe teste de mutagenicidade, competente em CYP e CYPOR, assegura o transporte de electrões de NADPH para CYP, permitindo determinar a mutagenicidade de vários compostos metabolizados por CYP (Kranendonk *et al.*, 1999a; Kranendonk *et al.*, 1999b).

I.3.1.2.2.2 Expressão heteróloga de SULTs humanas

A expressão heteróloga de SULTs humanas em sistemas teste de mutagenicidade tem sido maioritariamente desenvolvida por Glatt e colaboradores, em estirpes teste de *S. typhimurium* (Glatt, 2000a). O uso desta tecnologia tem mostrado grande sensibilidade na detecção de genotóxicos bioactivados por SULTs pois, sistemas teste de mutagenicidade comuns podem ser deficientes em SULTs e, preparações sub-celulares hepáticas, tipicamente utilizadas na activação metabólica, padecem de PAPS, cofactor obrigatório de SULT.

Ainda que PAPS seja suplementado à fracção S9, a deslocalização dos ésteres de ácido sulfúrico reactivos, ou dos catiões gerados a partir destes (com tempos de semi-vida curtos), para o interior da célula indicadora, pode não ocorrer em extensão suficiente, o que limita a sensibilidade na detecção de mutagenicidade dos metabolitos bioactivados por SULTs (Glatt *et al.*, 1998).

A expressão de SULTs individuais humanos nos últimos anos, em estirpes de Ames, tem permitido uma melhor caracterização dos seus papéis na bioactivação de diferentes pro-carcinogéneos (Meinl *et al.*, 2002), nomeadamente, de numerosos álcoois benzílicos derivados de hidroxilaminas aromáticas e de vários hidrocarbonos aromáticos policíclicos (tabela I.6) (Glatt, 1997).

Por expressão de cDNA ou por purificação de enzimas humanas, tem sido demonstrado a capacidade de SULT1A1 metabolizar um vasto leque de compostos mutagénicos.

Tabela I.6 - Compostos bioactivados por SULTs humanos com efeitos mutagénicos já detectados em sistemas teste de mutagenicidade bacterianos.^a

Composto	Formas de SULT ^b / fonte utilizada
Hidroxilaminas aromáticas	
N-hidroxi-2-acetilaminofluoreno	1A1, 1A2, preparações sub-celulares hepáticas
2-Hidroxilamino-5-fenilpiridina	1A1, 1A2
N-hidroxi-2-acetilamino-5-fenilpiridina	1A1, 1A2
Álcoois benzílicos de hidrocarbonos aromáticos policíclicos	
9-hidroxi-10-metilantraceno	2A1, preparações sub-celulares hepáticas
9-hidroxi-10-metilantraceno	2A1
1-hidroxi-2-pireno	1A1, 1A2, 1A3, 1E1, 2A1, preparações sub-celulares hepáticas de rato e humanas
Furfuril álcool	1A1, 1A2, 1A3, 1C2, 1E1, 2A1
1-(1-pirenil)etanol	2A1, 1A1, 1E1, preparações sub-celulares hepáticas
1-(2-pirenil)etanol	Preparações sub-celulares hepáticas
7-hidroxi-12-metilbenz[a]antraceno	2A1, preparações sub-celulares hepáticas
1-hidroxi-3-metilcolantreno	2A1
2-hidroxi-3-metilcolantreno	2A1
3-hidroxi-3,4-dihidrociclopenta[cd]pireno	Preparações sub-celulares hepáticas
4-hidroxi-3,4-dihidrociclopenta[cd]pireno	Preparações sub-celulares hepáticas
4-hidroxiciclopenta[def]criseno	1B1, 1E1, preparações sub-celulares hepáticas
6-Hidroxi-10-metilbenzo[a]pireno	2A1, 1B1, preparações sub-celulares hepáticas
7-hidroxi-7,8,9,10-tetrahidrobenzo[a]pireno	1A1, 1E1, 2A1
10-hidroxi-7,8,9,10-tetrahidrobenzo[a]pireno	1E1
8-hidroxi-8,9,10,11-tetrahidrobenz[a]antraceno	1E1
Outros álcoois alílicos e benzílicos	
1-hidroxisafrole	2A1
5-hidroxi-2-furfural	1A1
Hicantona	2A1

^a Preparações sub-celulares hepáticas, SULTs purificadas, ou SULTs heterologamente expressas foram utilizadas como sistemas de activação. Quando sistemas de activação sub-celulares externos foram utilizados, a presença de PAPS bem como uma fonte de SULT, serviram para demonstrar a dependência de SULT na indução de genotoxicidade. Quando SULT foi heterologamente expressa nas células indicadoras, células bacterianas transformadas e não transformadas foram utilizadas como controlo. ^b Foram utilizadas SULTs recombinantes.

Fonte: adaptado de Glatt (1997, 2000).

A forma SULT1A1 humana é a que exhibe maior nível de expressão entre todas as enzimas SULT1 no fígado, sendo também expressa a um baixo nível em todos os tecidos extra-hepáticos. Devido ao seu largo espectro de substratos com estruturas muito diversas (tabela I.6), suas propriedades de cinética e seus elevados níveis de expressão, SULT1A1 parece ser a principal forma humana de SULT envolvida na destoxificação da maioria dos principais xenobióticos fenólicos, bem como de outros substratos (Glatt e Meini, 2004).

I.4 Objectivo

O presente trabalho está integrado no âmbito de um projecto que visa estudar os mecanismos bioquímicos envolvidos na toxicidade associada à administração do fármaco antiretroviral NVP. Várias evidências apontam para que a toxicidade de NVP seja causada pela bioactivação de NVP a electrófilos reactivos, por acção de CYP, originando o composto estável 12-hidroxi-NVP, e subsequente sulfatação, mediada por SULT.

O objectivo deste trabalho centrou-se no desenvolvimento de novos sistemas teste de mutagenicidade bacterianos, competentes em SULT1A1 humano, e sua aplicação no estudo da bioactivação de 12-hidroxi-NVP, metabolito de fase I da biotransformação de NVP. Para este fim, foram construídas novas estirpes de *S. typhimurium* e de *E. coli*, derivadas de estirpes de Ames e da estirpe BTC, respectivamente. Após construção, estas estirpes foram caracterizadas e validadas recorrendo a compostos que se conhece serem bioactivados por SULT1A1 humano. Subsequentemente, as novas estirpes teste foram aplicadas no estudo da bioactivação de NVP, dependente de SULT humano.

A detecção de mutagenicidade de 12-hidroxi-NVP, através dos novos sistemas teste de mutagenicidade competentes em SULT1A1 humano, é indicadora de que este metabolito, quando sulfatado, origine moléculas electrofílicas altamente reactivas, capazes de formar adutos com o DNA de células humanas.

A bioactivação de 12-hidroxi-NVP, e consequente formação de adutos covalentes com proteínas, DNA e outros alvos, pode ser responsável pelos efeitos secundários associados à administração de NVP, designadamente hepatotoxicidade e erupções cutâneas, bem como, pela sua suspeita carcinogenicidade.

II Materiais e Métodos

II.1 Materiais

Nas tabelas II.1 – II.5 encontram-se descritos os reagentes, soluções, meios de cultura, estirpes e plasmídeos incluídos no corrente estudo.

Tabela II.1 - Reagentes utilizados na execução deste trabalho, e respectivos fabricantes.

Fabricante	Reagente
Becton Dickinson and Company	Bacto agar; Bacto agar MacConkey; Bacto extracto de levedura; Bacto peptona; Bacto triptona
Bioline	Agarose; marcador de pesos moleculares HyperLadder I™
Bio-Rad	Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels (4 – 20%)
Fermentas	dNTP mix; enzimas de restrição (<i>DraI</i> , <i>Eco81I</i> , <i>Sall</i> , <i>XbaI</i>); FastAP™; GeneJET™ PCR Purification Kit; GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit; PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Phusion HF buffer
Invitrogen	PuriLink™ Gel extraction; WesternDot™ 625 Goat Anti-Rabbit Western Blot Kit
Merck	Químicos incluídos na preparação das soluções (tabela II. 2)
Oxoid	Nutrient broth no. 2
QIAGEN	QIAfilter™ Plasmid Midi Kit
Roche	Rapid DNA Ligation Kit
Sigma Chemical Co	Ácido δ-aminolevulínico (δ-Ala); ampicilina (Amp); L-arginina (L-arg); brometo de etídeo; D-biotina (D-bio); cloranfenicol (Cm); 1-hidroximetilpireno (1-HMP); 12-hidroxi-Nevirapina (12-OH-NVP); L-histidina.HCl (L-his); isopropil β-D-tiogalactósido (IPTG); 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO); 4-nitro-o-phenilenediamina (NPD); sulfato de canamicina (Kan); tiamina (Thy)
Stratagene	Células competentes <i>E. coli</i> XL10-Gold®

Tabela II.2 - Soluções utilizadas, e sua composição.

Solução	Composição por 1L
Histidina/Biotina (0,5mM)	123,6 g D-bio; 96 g L-hist ^{a, b}
Sais M9 (5x)	64 g Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O; 150 g KH ₂ PO ₄ ; 2,5 g NaCl; 5 g NH ₄ Cl ^a
Sais VB (50x)	10 g MgSO ₄ .7H ₂ O; 100 g C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O; 500 g K ₂ HPO ₄ ; 175 g NaH ₂ NH ₄ (PO ₄ .H ₂ O) ^a
Tampão PBS	8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na ₂ HPO ₄ ; 0,24 g KH ₂ PO ₄ (ajustar pH a 7,4)
Tampão TAE (50x)	242 g Tris.base; 57,1 mL ácido acético glacial; 100 mL EDTA (0,5 M) (ajustar a pH 8)
Tampão TB	23,1 g KH ₂ PO ₄ ; 125,4 g K ₂ HPO ₄ ^a
Tampão TN	6,06 g Tris-HCl; 8,5 g NaCl (ajustar pH a 7,5) ^b

Tabela II.2 - Soluções utilizadas, e sua composição (continuação).

Tampão de corrida (5x)	5 g SDS; 15,14 g Trizma.base; 93,84 g Glicina
Tampão de transferência (5x)	1,33 g SDS; 19,37 g Trizma.base; 9,76 g Glicina; 333,33 mL Metanol

^a Autoclavar 20 minutos a 120°C. ^b Conservar a 4°C.

Tabela II.3 - Meios de cultura utilizados, e sua composição.

Meio de cultura	Composição por 1L
Luria – Bertani (LB)	5 g Bacto extracto de levedura; 10 g NaCl; 10 g Bacto triptona ^{a, b}
Nutrient broth no.2 (NB)	25 g ^{a, b}
Meio A	1,6 g NB (<i>S. typhimurium</i>) ou TB/peptona (<i>E. coli</i>); 5g NaCl
M9	15 mg agar; 10mL glucose (40% v/v); 200 mL sais M9 (5x) ^a
NZY	10 g Bacto triptona; 5 g NaCl; 5 g Bacto extracto de levedura (ajustar pH a 7,5) ^a ; suplementar com 12,5 mL MgCl (1M), 12,5 mL MgSO ₄ (1M) e 20 mL glucose 20%
SOB	20 g Bacto triptona; 5 g Bacto extracto de levedura; 0,5 g NaCl; 10 mL KCl (250mM) ^a ; suplementar com 5 ml MgCl ₂ (2M) (ajustar pH a 7) ^b
Terrific Broth (TB)/peptona	12 g Bacto triptona; 24 g Bacto extracto de levedura; 2 g Bacto peptona; 8 mL glicerol 50% ^a ; suplementar com 100 mL tampão TB
Top-agar para aplicação em testes de mutagenicidade	5 g NaCl; 6 g agar ^a ; suplementar com 100 mL solução histidina/biotina (0,5 mM) (<i>S. typhimurium</i>) ou 1,6 mL L-arg (10mg/mL) e 1,6 mL Thy (10 mg/mL) (<i>E. coli</i>)
Vogel-Bonner (VB)	15 g agar ^a ; suplementar com 20 mL sais VB (50x) e 50 mL glucose 40%

^a Autoclavar 20 min. a 120°C. ^b Para preparação de meio em placas ou em tops-agar, adicionar 15 g ou 4,8 g de agar, respectivamente, antes da autoclavagem.

Tabela II.4 - Estirpes de *E. coli* e de *S. typhimurium* e plasmídeos utilizados no decorrente estudo.

Estirpe	Genótipo	Origem/referência
<i>E. coli</i>		
PD301	<i>thr-1, ara-14, leuB6, Δ(gtp-proA)62, thi-1, lacY1, galk2, xyl-5, mtl-1, supE44, argE3, hisG4, rac⁻, λ⁻, tsx-33, rpsL31, mgl-51, rfbD1, kdgK51, qsr⁻, uvrA6, galE, ada10 [tet^r], Δogt::cmr, LPS^d</i>	P. Duarte
BTC	PD301/pCWΔpLCM_POR	Este estudo
BTC2A6_SULT1A1_POR	PD301/pCW2A6/pLCM_hSULT1A1_POR	Este estudo
BTC_SULT1A1	PD301/pCWΔpLCM_hSULT1A1	Este estudo
<i>S. typhimurium</i>		
TA1535	<i>hisG46, Δ(gal-uvrB), rfa⁻</i>	B.N. Ames
TA100	TA1535/pKM101	B.N. Ames
TA1535_pKKSULT1A1	TA1535/ pKK233-2_hSULT1A1	H. Glatt
TA1535_pLCMSULT1A1	TA1535/pCWΔpLCM_hSULT1A1	Este estudo
TA1535_pLCMSULT1A1_cys	TA1535/pCWΔpLCM_hSULT1A1_cys	Este estudo
TA1538	<i>hisD3052, Δ(gal-uvrB), rfa⁻</i>	B.N. Ames

Tabela II.4 - Estirpes de *E. coli* e de *S. typhimurium* e plasmídeos utilizados no decorrente estudo (continuação).

TA98	TA1538/pKM101	B.N. Ames
TA1538_pKKSULT1A1	TA15358/pKK233-2_hSULT1A1	H. Glatt
TA1538_pLCMSULT1A1	TA1538/pCWΔ/pLCM_hSULT1A1	Este estudo
TA1538_pLCMSULT1A1_cys	TA1538/pCWΔ/pLCM_hSULT1A1_cys	Este estudo

Tabela II.5 - Plasmídeos utilizados neste estudo.

Plasmídeos	Marcadores genéticos	Origem/referência
pCWΔ	pCWori ⁺ , vector de expressão em <i>E. coli</i> , Amp ^r , ptac.ptac/lacI ^q , sem cDNA	C. W. Fisher
pCW _{h2A6}	pCWori ⁺ , vector de expressão em <i>E. coli</i> , Amp ^r , ptac.ptac/lacI ^q , contendo cDNA de CYP2A6 humano	M. Kranendonk
pKK233-2_hSULT1A1	pKK233-2, contendo cDNA de SULT1A1 humano, sob indução de ptac	H. Glatt
pLCM	<i>mucAB</i> ⁺ , Kan ^r derivado do plasmídeo pACYC177	M. Kranendonk
pLCM_POR	pLCM, contendo cDNA de CYPOR humano, sob indução de ptac	M. Kranendonk
pLCM_hSULT1A1	pLCM, contendo cDNA de SULT1A1 humano, sob indução de ptac	Este estudo
pLCM_hSULT1A1_POR	pLCM, contendo cDNA de SULT1A1 e de CYPOR humanos, ambos sob indução de ptac	Este estudo
pLCM_hSULT1A1_cys	pLCM, contendo o operon <i>cysDNC</i> e cDNA de SULT1A1 humano sob indução de ptac	Este estudo

II.2 Métodos

II.2.1 Condições de cultura das estirpes bacterianas

Como meio de cultura para as estirpes bacterianas, foram utilizados diferentes meios sólidos ou líquidos, cuja composição se encontra descrita na tabela II.3, suplementados com os respectivos antibióticos. Estirpes *rfa*⁻ foram crescidas em meios contendo 50 µg/mL de ampicilina (Amp), 15 µg/mL de canamicina (Kan) e/ou 10 µg/mL de cloranfenicol (Cm), de acordo com o seu genótipo. Estirpes *rfa*⁺ cresceram em meios contendo 100 µg/mL de Amp e/ou 35 µg/mL Kan, de acordo com o seu conteúdo plasmídico.

Os meios sólidos em placa foram preparados em placas de Petri de poliestireno, estéreis, com fundo liso e 9 cm de diâmetro. O volume de meio por placa foi 25 mL. Na preparação de tubos tops-agar, adicionou-se 2,5 mL de meio em tubos de vidro estéreis, de 100 x 10 mm.

II.2.1.1 Culturas sem indução da expressão heteróloga

As culturas bacterianas sem indução da expressão de proteínas heterólogas foram realizadas em tubos de vidro estéreis, de 150 x 15 mm, com 5 mL de meio LB (estirpes de *E. coli*) ou NB (estirpes de *S. typhimurium*), suplementado com os respectivos antibióticos, de acordo com a estirpe. Os inóculos utilizados foram provenientes de culturas (15% v/v glicerol) armazenadas a -80°C, ou de colónias crescidas em placa. As culturas foram incubadas 16 horas, a 37°C, com uma agitação de 210 rpm em incubadora orbital. Após este período, as culturas bacterianas encontravam-se em fase estacionária, com uma densidade celular de $1 - 2 \times 10^9$ células/mL.

Para preparação de células competentes para electroporação, 50 mL de meio líquido, LB (para transformação de estirpes de *E. coli*) ou NB (para transformação de estirpes de *S. typhimurium*), contendo os antibióticos adequados, em Erlenmeyers (250 mL), foram inoculados com colónias previamente crescidas em placas, contendo o mesmo meio, suplementado com antibióticos conforme o genótipo da estirpe. As culturas foram incubadas em incubadora orbital, termostaticada a 37°C, com agitação de 210 rpm, até atingir DO_{600} 0,4 - 0,6. Para preparação de células quimicamente competentes, o crescimento da cultura foi semelhante, no entanto, utilizou-se SOB como meio de cultura, e o crescimento das estirpes finalizou-se com DO_{600} 0,25 - 0,30.

As culturas destinadas ao isolamento de DNA plasmídico em larga escala realizaram-se em Erlenmeyers (250 mL), contendo 50 mL de meio, suplementado com os antibióticos, de acordo com a estirpe. Inocularam-se 250 µL de cultura bacteriana (15% v/v glicerol), armazenada a -80°C e, incubaram-se as culturas durante aproximadamente 18 horas, a 37°C, em incubadora orbital, a 210 rpm.

II.2.1.2 Culturas com indução da expressão heteróloga

As culturas bacterianas com indução da expressão de proteínas heterólogas foram realizadas em tubos de poliestireno estéreis, de 100 x 16 mm, com 5 mL de meio TB/peptona (estirpe BTC_SULT1A1) ou NB (estirpes de *S. typhimurium*), suplementado com os respectivos antibióticos, de acordo com a estirpe. As culturas de BTC_SULT1A1, também foram suplementadas com 1 µg/mL de tiamina (Thy). A expressão heteróloga de hSULT1A1, e do operão *cysDNC* foi induzida por ITPG (0,2 mM), inicialmente adicionado ao meio. As culturas foram inoculadas com um volume de 25 µL de cultura bacteriana (15% v/v glicerol) armazenada a -80°C, e incubadas a 37°C, com agitação de 210 rpm em incubadora orbital. Atingidas as densidades de cultura pretendidas (secção III.3.3), as culturas foram mantidas em gelo pelo menos 15 minutos, centrifugadas, ressuspensas em meio A (secção II.3) e ajustadas para 1×10^9 bactérias/mL. Pouco antes da sua utilização, as culturas foram, mais uma vez, centrifugadas e ressuspensas no referido meio, para uma densidade 5 vezes superior.

O crescimento com indução da expressão de CYP na estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR realizou-se de acordo com as condições de cultura descritas por Kranendonk *et al.* (1999a).

II.2.2 Cálculo das unidades formadoras de colónias

Para calcular as unidades formadoras de colónias (UFCs) das estirpes desenvolvidas, realizaram-se diluições sequenciais das culturas, com e sem indução da expressão heteróloga (secções II.2.1.1 e II.2.1.2), em PBS, até um factor de diluição de 10^7 . Num top-agar, contendo meio LB (estirpes de *E. coli*) ou NB (estirpes de *S. typhimurium*), pré-aquecido entre 45 e 47°C, adicionaram-se 100 µL de suspensão bacteriana, com os factores de diluição 10^6 e 10^7 . Em seguida, o top-agar foi vertido e espalhado em placas contendo meio LB ou NB, suplementado com os respectivos antibióticos, de acordo com a estirpe (secção II.2.1). As placas foram incubadas a 37°C, durante 24 horas. O ensaio foi realizado em duplicado. Após incubação, as colónias foram fotografadas e contadas, recorrendo ao software Labworks (versão 4.6) (UVP, Inc. USA). As UFCs foram estimadas pela multiplicação da média da contagem nas placas, pelo factor de diluição final.

II.2.3 Extração de DNA plasmídico

O isolamento de DNA plasmídico das estirpes bacterianas construídas, foi efectuado recorrendo ao kit GeneJET™ Plasmid Miniprep. Nos casos em que se pretendeu obter DNA plasmídico com elevado rendimento, utilizou-se o kit QIAfilter™ Plasmid Midi. Ambos os protocolos de purificação plasmídica baseiam-se num procedimento de lise alcalina das culturas bacterianas, seguida de ligação do DNA plasmídico à resina de troca iónica da coluna, em condições de pH e concentração de sais apropriadas. O DNA adsorvido foi lavado e eluído.

II.2.3.1 Análise electroforética de DNA plasmídico

O volume de amostra utilizada para electroforese horizontal em gel de agarose foi de 1-3 µL, consoante a concentração obtida por isolamento do DNA plasmídico (~ 40 – 100 ng/µL). Perfez-se um volume de 10 µL com H₂O e adicionaram-se 2 µL de *loading buffer* (Bioline). Preparou-se uma solução 0,6% de agarose em tampão TAE, pH 8, e adicionou-se brometo de etídeo. O marcador de pesos moleculares (HyperLadder I), as amostras, e os controlos foram carregados nos poços do gel de agarose, o qual foi submetido a uma voltagem de 90 V. A electroforese realizou-se em tampão TAE e, no final da corrida, os géis foram visualizados e fotografados sob luz UV (254 nm).

II.2.4 Construção dos plasmídeos envolvidos no estudo

II.2.4.1 Construção dos plasmídeos pLCM_hSULT1A1_POR e pLCM_hSULT1A1

II.2.4.1.1 Amplificação e purificação do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y

A amplificação do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y realizou-se a partir do vector pKK233-2_SULT1A1*1Y (em anexo, figura VI.3), cedido pelo Doutor H. Glatt e pelo Doutor W. Meindl (German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrücke, Alemanha), utilizando o par de *primers* F1SULT, 5' – GACTTGTCTGACCGAGCCATCGGAAGCTGT -3' (introduzindo um local de restrição para *Sall*) e R1SULT, 5' – GTTCTAGACTCTCACAGCTCAGAGCGGAAGCTGA - 3' (introduzindo um local de restrição para *XbaI*) (STABVIDA). A reacção de PCR consistiu em 30 ciclos de desnaturação a 98°C, durante 10 segundos, e de *annealing*/extensão, a 72°C, durante 30 segundos. O produto de PCR foi analisado por electroforese. Em seguida, procedeu-se à purificação do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y, utilizando o kit PuriLink™ PCR purification (Fermentas), de acordo com as indicações do fabricante, e quantificou-se em gel de agarose 0,6%.

II.2.4.1.2 Digestão enzimática do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y, e dos vectores pLCM_POR e pLCM

As enzimas de restrição utilizadas na digestão do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y (1320 pb) e dos vectores pLCM_POR (em anexo, figura VI.2) e pLCM (em anexo, figura VI.4) foram *Sall* e *XbaI*. As digestões por *Sall* e *XbaI* foram realizadas sequencialmente. Cada uma das digestões foi incubada 5 horas, a 37°C. Para desfosforilar as extremidades dos vectores pLCM_POR e pLCM, adicionaram-se 4 µL de FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas) e incubou-se por um período de 30 minutos, a 37°C.

II.2.4.1.3 Isolamento do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y, e dos vectores pLCM_POR e pLCM

Após digestão, fez-se uma electroforese e cortaram-se as bandas do gel correspondentes aos vectores e ao fragmento digeridos. O DNA isolado foi purificado de acordo com o protocolo do kit PuriLink™ Gel extraction (Invitrogen). Seguidamente, fez-se a precipitação do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y e do vector pLCM_POR pela adição de 1/10 (v/v) de acetato de sódio (3 M), 2 vezes o volume de etanol absoluto e 15 µL de LPA (*linear polyacrylamide*). Incubou-se a -20°C, durante 16 horas e, seguidamente, a amostra foi centrifugada 30 minutos, a 4°C, a 21000 g. O sedimento resultante foi lavado com etanol 70% e procedeu-se a uma nova centrifugação de 10 minutos, a 4°C, a 21000 g. O DNA foi seco a 42°C, aproximadamente 10 minutos e, em seguida, ressuspendido em tampão ligase, proveniente do kit Rapid DNA Ligation (Roche).

II.2.4.1.4 Ligação do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y aos vectores pLCM_POR e pLCM, e transformação de *E. coli* XL10-GOLD

Para ligação do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y aos vectores pLCM_POR e pLCM, utilizou-se o Rapid DNA Ligation Kit™ (Roche), seguindo-se as instruções do fabricante. O rácio molar de vector:fragmento aplicado foi de 1:4. Após ligação, procedeu-se à transformação da estirpe de *E. coli* XL10-Gold (Stratagene), seguindo-se o procedimento do manual.

II.2.4.1.5 Verificação da clonagem do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y nos vectores pLCM_POR e pLCM

Para confirmar a clonagem de pTAC_SULT1A1*1Y, foi extraído o DNA plasmídico de algumas das colónias transformadas com pLCM_hSULT1A1_POR, e algumas das colónias transformadas com pLCM_hSULT1A1, e analisou-se o seu DNA plasmídico em gel de agarose. Seleccionaram-se as colónias que aparentemente incorporaram o fragmento pTAC_SULT1A1*1Y, cujo DNA plasmídico foi isolado e linearizado com *Eco81I*, confirmando-se a incorporação do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y. O DNA plasmídico destes transformantes foi sequenciado (STABVIDA), usando os *primers* F1SULT e R1SULT.

II.2.4.2 Construção do plasmídeo pLCM_hSULT1A1_cys

Como template da reacção de PCR, utilizou-se DNA cromossomal da estirpe PD301 de *E. coli*. Para amplificar o fragmento *cysDNC* (em anexo, figura VI.5), utilizou-se o par de primers F1cys, 5' - GATCTAGAATGGATCAAATACGACTTACTC - 3', e, R1cys, 5' - AGTCTAGATCAGGATCTGATAATATCGTTC - 3' (introduzindo locais de restrição para *XbaI*). A reacção de PCR consistiu em 30 ciclos de desnaturação a 98°C (10 segundos), *annealing* a 67°C (30 segundos) e de extensão a 72°C (45 segundos). O produto de PCR foi purificado, utilizando o kit PuriLink™ PCR purification (Fermentas), e quantificou-se em gel de agarose 0,6%. Para digerir o fragmento *cysDNC* (3821 pb) e o vector pLCM_hSULT1A1 (7093 pb), utilizou-se a enzima *XbaI*. Confirmados os tamanhos dos produtos da digestão por electroforese, procedeu-se ao seu isolamento, utilizando o kit PuriLink™ Gel extration (Invitrogen). O DNA foi precipitado e lavado de acordo com o procedimento indicado em II.2.4.1.3. Seguidamente, o fragmento *cysDNC* foi ligado ao vector pLCM_hSULT1A1 com recorrência ao Rapid DNA Ligation Kit™, seguindo-se as instruções do fabricante. O rácio molar de vector:fragmento utilizado foi 1:2. Após ligação, procedeu-se à transformação da estirpe de *E. coli* XL10-Gold (Stratagene), seguindo-se o procedimento do manual. Para identificar os transformantes que incorporaram o fragmento *cysDNC* na orientação pretendida, o DNA plasmídico dos transformantes foi digerido com as enzimas *XbaI* e *DraI*, e correu-se um gel de agarose 0,6%. A clonagem do operão *cysDNC* foi confirmada por sequenciação (STABVIDA).

II.2.5 Introdução de DNA plasmídico em bactérias

II.2.5.1 Preparação de células competentes

Para construir as estirpes teste de mutagenicidade envolvidas neste estudo, foi necessário um tratamento prévio das células, de forma a torná-las quimicamente competentes e electrocompetentes, capazes de captar DNA plasmídico com elevada eficiência.

Para preparação de células competentes para electroporação, a estirpe a transformar foi crescida sem indução da expressão heteróloga, em meio adequado, e sob as condições mencionadas em II.2.1.1. Subsequentemente, o volume de cultura foi dividido por dois tubos de Falcon (50 mL), os quais foram mantidos em gelo durante 15 minutos. Seguidamente, as culturas foram centrifugadas 15 minutos, a 4°C, com rotação de 2772 g e, os sedimentos, ressuspensos em 2 mL de H₂O nanopura estéril, a 4°C. Juntaram-se as suspensões, adicionaram-se 20 mL de H₂O nanopura estéril, e procedeu-se a uma nova centrifugação de 15 minutos, a 4°C, com rotação de 2772 g. O sedimento obtido foi ressuspendido em 1 mL de glicerol (15%) e, depois de aliquoteadas (30 µL), as células foram congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C.

Para preparação de células quimicamente competentes, após crescimento em respectivos meios, e sob as condições mencionadas em II.2.1.1, o volume de cultura foi dividido por dois tubos de Falcon (50 mL). Após 15 minutos em gelo, as culturas foram centrifugadas 8 minutos, a 4°C, com rotação de 2772 g, e os sedimentos ressuspensos em 5 mL CaCl₂ (0,1 M). Juntaram-se as suspensões, e procedeu-se a uma nova centrifugação de 6 minutos, a 4°C, com rotação de 2772 g. O sedimento obtido foi ressuspendido com 2 mL de CaCl₂ (0,1 M) e adicionou-se glicerol (15% v/v). Depois de aliquoteadas (200 µL), as células foram armazenadas a -80°C.

II.2.5.2 Transformação de células competentes com DNA plasmídico

Plasmídeos previamente de *E. coli*, utilizados na transformação de estirpes de Ames (*S. typhimurium*), foram adaptadas ao padrão de metilação de *S. typhimurium*, por transformação da estirpe LB5010 (r⁻, m⁺), sendo subsequentemente isolados (Bullas e Ryu, 1983).

II.2.5.2.1 Transformação por electroporação de estirpes LPS^d/rfa⁻

A electroporação das células foi efectuada, adicionando 1 µL de DNA plasmídico a 30 µL de células competentes (secção II.2.5.1). A mistura de células com DNA plasmídico foi pipetada numa cuvette de electroporação, a qual foi inserida no electroporador (Bio-Rad Gene Pulser®). Sob as condições seleccionadas, 1,35 kV, 200 Ω e capacitador de 25 µF, as células foram expostas a um T 4 – 5 ms. As células electroporadas foram imediatamente recuperadas em 1 mL de meio NZY e incubadas durante 1 hora, a 37°C, com agitação de 210 rpm em incubadora orbital. Após incubação, foram plaqueados, em meio LB (*E. coli*) ou NB (*S. typhimurium*), suplementado com os respectivos

antibióticos (secção II.2.1), 50 µL e 200 µL de cultura transformante. As placas foram incubadas 16 horas, a 37°C.

II.2.5.2.2 Transformação química de estirpes LPS^d/rfa⁻

A transformação química foi a via secundária utilizada para transformar a estirpe TA1538. Neste procedimento, adicionaram-se de 5 µL de DNA plasmídico a um tubo de *ependorf* contendo 200 µL de células quimicamente competentes (secção II.2.5.1). As células foram mantidas 30 minutos em gelo e, seguidamente, recuperadas com 800 µL de meio NB. As células em meio enriquecido foram incubadas durante 1 hora, a 37°C, com agitação de 210 rpm em incubadora orbital. Após incubação foram plaqueados em meio NB, suplementado com os respectivos antibióticos, 50 µL e 200 µL de cultura transformante (secção II.2.1). As placas foram incubadas 16 horas, a 37°C.

II.2.6 Verificação das características fenotípicas das estirpes

Construídas as estirpes, prepararam-se culturas em meios suplementados com os respectivos antibióticos, as quais foram incubadas durante 16 horas, a 37°C, com agitação de 210 rpm (secção II.2.1.1). Em seguida, procedeu-se à verificação das características fenotípicas das estirpes teste de mutagenicidade, seguidamente referidas.

II.2.6.1 Auxotrofia para L-arginina e para L-histidina

A auxotrofia das estirpes de *S. typhimurium* e de *E. coli*, por L-histidina (L-his) e L-arginina (L-arg), respectivamente, foi confirmada pelo crescimento bacteriano em placas M9 selectivas.

Culturas de estirpes de *S. typhimurium* foram inoculadas em meio mínimo M9 sólido, suplementado apenas com biotina (0,74 µg/mL). Como controlo positivo, efectuou-se o mesmo procedimento, utilizando placas com meio M9 suplementadas com L-his (50 µg/mL) e D-biotina (0,74 µg/mL).

A auxotrofia de estirpes de *E. coli* por L-arg foi verificada, inoculando placas com meio mínimo M9, suplementado unicamente com Thy (1 µg/mL). Como controlo positivo utilizaram-se placas contendo o mesmo meio, suplementado com L-arg (100 µg/mL) e Thy (1 µg/mL).

II.2.6.2 Presença de LPS^d

Culturas das estirpes de *S. typhimurium* e de *E. coli* foram inoculadas em placas de agar MacConkey e testou-se a sensibilidade das mesmas ao cristal violeta, sais biliares, e outros compostos tóxicos existentes neste meio. A presença de parede lipopolissacarídica incompleta permite a entrada destes compostos, o que inviabiliza o crescimento bacteriano.

II.2.7 Confirmação da sensibilidade de detecção de mutagenicidade por parte das estirpes de *S. typhimurium* e de *E. coli*

A monitorização da reversão das mutações *hisG46* e *hisD3052*, pelas estirpes teste de *S. typhimurium*, e da mutação *argE3*, pelas estirpes teste de *E. coli*, fez-se pela aplicação de testes de mutagenicidade com químicos diagnóstico, específicos para cada estirpe, que funcionaram como controlo positivo. As estirpes cresceram como descrito em II.2.1.1, até uma densidade de $1 - 2 \times 10^9$ células/mL.

Num top-agar His/Bio ou Arg/Thy, de acordo com a estirpe teste, adicionaram-se 10 µL de composto teste, com uma concentração previamente definida, e 100 µL de cultura bacteriana. O top-agar foi vertido e espalhado em placas contendo meio mínimo VB, as quais foram incubadas a 37°C, durante 48 horas (no caso das estirpes derivadas de TA1538, 72 horas).

Após incubação, as colónias foram fotografadas e contadas, recorrendo ao software Labworks (versão 4.6) (UVP, Inc. USA). O ensaio foi realizado em duplicado.

II.2.8 Determinação da expressão de hCYP2A6

A determinação da expressão de CYP2A6 nas estirpes bacterianas BTC2A6_SULT1A1_POR foi efectuada por observação do espectro diferencial de CYP reduzido na presença de CO *versus* CYP reduzido. As culturas foram crescidas com indução da expressão heteróloga (secção II.2.1.2) e centrifugadas a 2772 g, durante 15 minutos, a 4°C, e os sedimentos foram ressuspensos no mesmo volume de tampão TN. Adicionou-se ditionido de sódio, obtendo-se uma concentração final de 4,6 mM, e a suspensão bacteriana foi dividida em duas cuvetes. Seguidamente, traçou-se a linha de base entre 400 e 500 nm num espectrofotómetro de feixe duplo (Shimadzu UV-Vis UV-2401PC), borbulhou-se a cuvette amostra com CO durante 30 segundos, e traçou-se um espectro diferencial entre 400 e 500 nm. Sabendo que o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do complexo CYP-CO é $91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, para uma diferença de absorvância entre 450 e 490 nm, foi possível determinar a concentração de CYP nas amostras.

II.2.9 Western blot de hSULT1A1 expresso nas diversas estirpes bacterianas

A preparação dos lisados celulares totais fez-se por solubilização das células em *loading buffer* (Tris.HCl 0,0625 M, glicerol 10% v/v, SDS 2% v/v, BFB 0,005% v/v, β -mercaptoetanol 5% v/v) a, aproximadamente, 6×10^8 células/mL na estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR e $1,2 \times 10^9$ células/mL em estirpes derivadas de TA1535 e TA1538. As fracções celulares foram, seguidamente, aquecidas a 95°C, durante 15 minutos. Depois de preparadas, as amostras foram carregadas no gel Mini-PROTEAN® TGX™ (Bio-Rad) 4 – 20%, e as proteínas do lisado celular foram separadas por SDS-PAGE (200 V), em tampão de corrida. Como controlo positivo, utilizou-se SULT1A1 humano parcialmente purificado, cedida pelo Doutor H. Glatt e pelo Doutor W. Meindl (German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrücke, Alemanha). Após corrida por electroforese vertical, procedeu-se à transferência electroforética das proteínas do gel para a membrana de PVDF 0,45 μ m (Immobilon-FL, Millipore corporation), por aplicação de uma voltagem de 100 V, durante 1 hora, em tampão de transferência. Seguidamente, fez-se a imunodeteção das proteínas, utilizando o kit WesternDot™ 625 Goat Anti-Rabbit Western blot (Invitrogen). Para prevenir ligações não específicas entre a membrana de PVDF e o anticorpo primário, a membrana foi incubada durante 1 hora com agente bloqueador. Posteriormente, fez-se a hibridação com o anticorpo primário policlonal anti-SULT1A1 (1:10000), cedido pelo Doutor H. Glatt e pelo Doutor W. Meindl (German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrücke, Alemanha), durante uma hora. A membrana foi lavada, e exposta ao anticorpo secundário conjugado com biotina, durante 1 hora. Após a segunda hibridação, a membrana foi novamente lavada e incubada 1 hora com o conjugado de streptavidina. Os immunoblots foram expostos a radiação UV (365 nm), e registados em suporte digital.

A quantificação relativa de SULT1A1 humano na fracção celular foi efectuada através da comparação entre o sinal obtido e a intensidade do sinal do controlo. Esta análise foi efectuada recorrendo ao software Labworks (versão 4.6) (UVP, Inc. USA).

II.2.10 Testes de mutagenicidade em estirpes bacterianas com expressão heteróloga de enzimas humanas

A mutagenicidade foi determinada usando o ensaio de pré-incubação líquida descrito por Glatt *et al.* (1998). O composto teste (em 10 μ L de DMSO) e a cultura bacteriana (100 μ L), crescida consoante as condições mencionadas em II.2.1.2, foram sequencialmente adicionados em tubos, contendo 500 μ L de $MgSO_4$ (100mM). Esta mistura foi incubada durante 60 minutos, a 37°C com agitação de 175 rpm, em incubadora orbital. Após incubação, tops-agar pré-aquecidos a 45 – 47°C, suplementados com L-His/D-Bio (estirpes de *S. typhimurium*) ou L-Arg/Thy (estirpes de *E. coli*), foram adicionados à solução bacteriana com o mutagénio. Esta mistura foi vertida em placas contendo meio mínimo VB, as quais foram incubadas a 37°C, durante 48 horas (no caso das estirpes derivadas de TA1538, 72 horas). O número de colónias revertentes foi estimado, recorrendo ao software Labworks (versão 4.6) (UVP, Inc. USA).

Para cada novo composto a testar numa determinada estirpe, inicialmente realizaram-se testes com doses crescentes de composto químico em escala logarítmica, em duplicado. Deste modo, foi possível observar o efeito mutagénico dos compostos químicos numa larga escala de doses, em estirpes específicas.

As respostas mutagénicas foram classificadas como positivas quando o número de revertentes aumentou no mínimo duas vezes acima do número de revertentes espontâneos, e se obteve uma relação dose-resposta linear. As actividades mutagénicas foram determinadas pelo declive da recta da curva dose-resposta obtida. A análise estatística dos resultados efectuou-se por aplicação do teste t.

III Resultados

III.1 Abordagem inicial sobre o desenvolvimento de uma estirpe teste de mutagenicidade competente em CYP e SULT humanos

A primeira fase do presente estudo teve como objectivo a construção de uma estirpe teste de mutagenicidade co-expressando CYP e SULT humanos, enzimas da fase I e da fase II, da biotransformação, respectivamente. A finalidade desta abordagem seria a construção, caracterização e validação de um sistema aplicável em estudos de mutagenicidade sobre a bioactivação do fármaco NVP, através da acção sequencial de CYP e de SULT humanos.

III.1.1 Construção do plasmídeo pLCM_hSULT1A1_POR

III.1.1.1 Clonagem do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y no vector pLCM_POR

Para construir o plasmídeo pLCM_hSULT1A1_POR (figura III.1), clonou-se o fragmento pTAC_SULT1A1*1Y, a 5' do cDNA codificante de CYPOR, no vector de expressão pLCM_POR (tabela II.5). A confirmação da clonagem foi feita por digestão enzimática do DNA plasmídico com *Eco81I*. Esta enzima corta pLCM_hSULT1A1_POR exclusivamente em dois locais, sendo um deles no cDNA codificante de CYPOR, e o outro, no cDNA codificante de hSULT1A1. Por análise electroforética dos produtos da digestão, obtiveram-se duas bandas, uma delas com aproximadamente 9000 pb, e outra com sensivelmente, 1200 pb, em todos os transformantes (figura III.2).

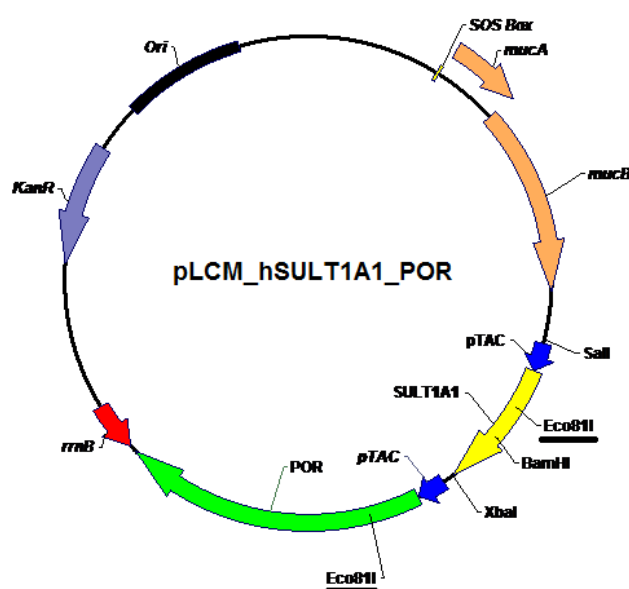


Figura III.1 – Representação esquemática do plasmídeo pLCM_hSULT1A1_POR (10184 pb). Os locais de restrição da enzima *Eco81I* (posições 3441 e 4676) encontram-se sublinhados a preto.

Após sequenciação e análise do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y de todos os transformantes, seleccionou-se o DNA plasmídico do candidato com a melhor qualidade de sequenciação, confirmando a clonagem de pTAC_SULT1A1*1Y (transformante 2).

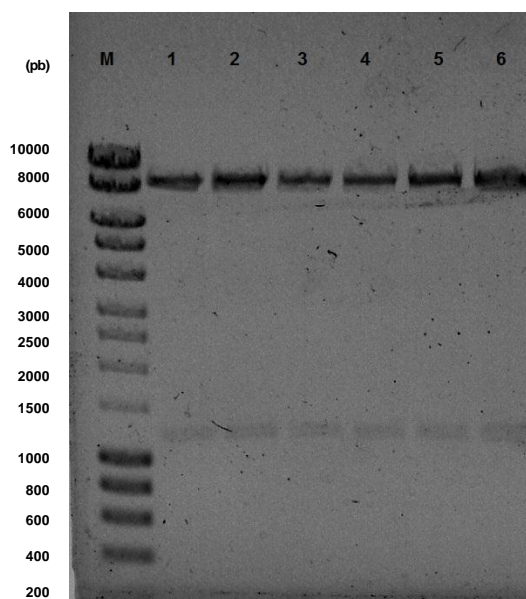


Figura III.2 – Electroforese em gel de agarose, dos produtos de digestão do plasmídeo pLCM_hSULT1A1_POR, presente em 6 transformantes, com a enzima de restrição *Eco81I*. M, fragmentos de DNA linear (marcador); 1 – 6, transformantes 1 - 6.

III.1.2 Desenvolvimento da estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR

III.1.2.1 Transformação da estirpe PD301, confirmação das características fenotípicas da estirpe, e análise da estabilidade do DNA plasmídico

Para construir a estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR, a estirpe PD301 (estirpe mãe da estirpe BTC) (tabela II.4) foi transformada por electroporação, com os plasmídeos pLCM_hSULT1A1_POR e pCWh2A6 (tabela II.5; em anexo, figura VI.1), simultaneamente.

A confirmação das características de auxotrofia para L-arg (secção II.6.1) e presença de LPS^d (secção II.6.2) fez-se por utilização de meios selectivos, e a coexistência estável dos plasmídeos foi confirmada por electroforese (dados não apresentados).

III.1.2.2 Sensibilidade da estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR na detecção de mutagenicidade, sem expressão heteróloga de proteínas humanas

Para confirmar a sensibilidade do alvo genético dos transformantes da estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR (II.2.7), utilizou-se o mutagénio diagnóstico 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) pois, estudos prévios demonstrados por Duarte *et al.* (2005), mostraram a sua aplicabilidade e eficácia em estirpes teste BTC-CYP. Todos os transformantes BTC2A6_SULT1A1_POR (1 - 6), crescidos sem indução da expressão heteróloga (II.2.1.1), foram testados com este composto e,

como controlo positivo, utilizou-se a estirpe BTC2A6_POR (Duarte *et al.*, 2005) (figura III.3). Os transformantes 3 e 5 foram os que mostraram melhor resposta mutagénica (revertentes induzidos) ao composto 4-NQO.

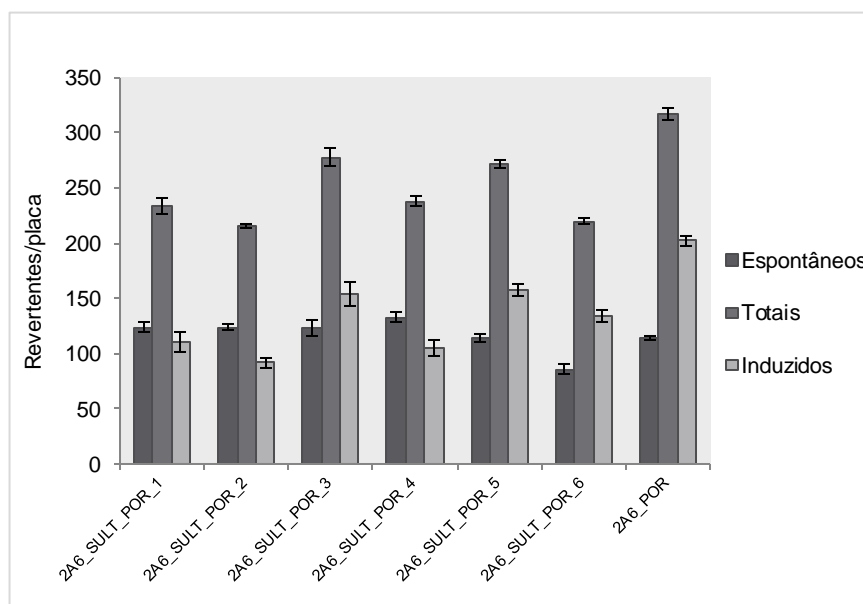


Figura III.3 – Mutagenicidade induzida por 4-NQO (0,15 µg/placa) nos transformantes BTC2A6_SULT1A1_POR (1 - 6) e na estirpe controlo, BTC2A6_POR.

III.1.2.3 Análise da expressão das proteínas heterólogas CYP2A6 e SULT1A1 humanas

A capacidade de expressão de hCYP2A6 nos transformantes de BTC2A6_SULT1A1_POR foi feito pelo método de espectrofotometria diferencial. Em todos os transformantes foi registado um pico de absorvância a comprimentos de onda próximos de 450 nm quando o ferro hémico de CYP reduzido foi complexado com CO (figura III.4). No entanto, os valores foram inferiores aos da estirpe controlo BTC2A6_POR. Os transformantes 4 e 6 foram os que apresentaram os maiores conteúdos de CYP (tabela III.1).

Tabela III.1 - Conteúdo de CYP e CYP/DO₆₀₀ dos das culturas dos transformantes BTC2A6_SUL1A1_POR e da estirpe controlo BTC2A6_POR.

Transformante	[CYP] (nM)	[CYP] (nM)/DO ₆₀₀
1	124 ± 5E-04	25 ± 6
2	128 ± 5E-04	26 ± 6
3	91 ± 6E-04	18 ± 7
4	141 ± 9E-04	28 ± 10
5	127 ± 3E-04	26 ± 4
6	131 ± 4E-04	29 ± 4
C	300 ± 7E-04	51 ± 8

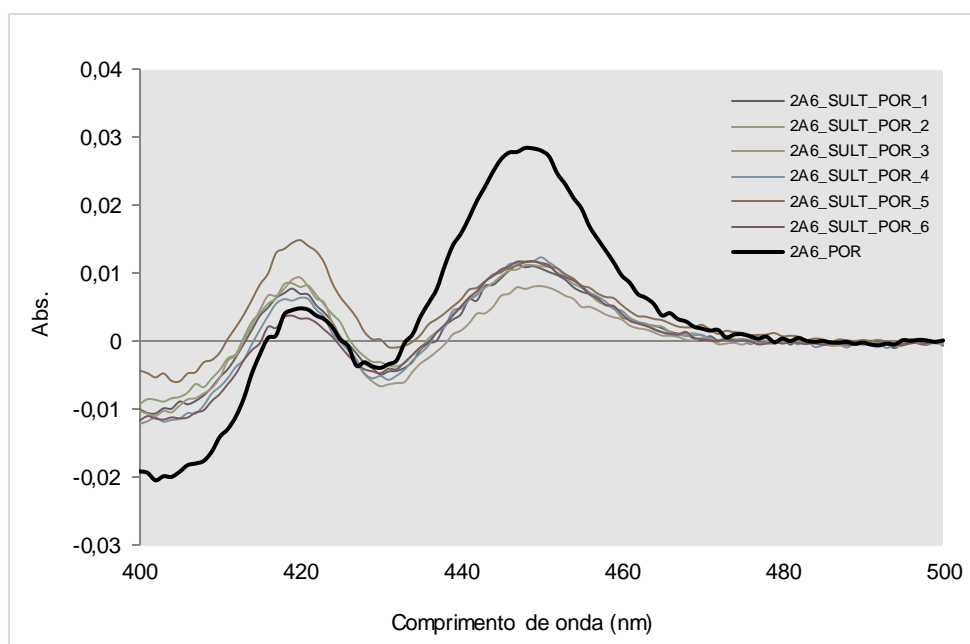


Figura III.4 – Espectro diferencial de hCYP2A6 das culturas dos transformantes de BTC2A6_SULT1A1_POR e da estirpe controlo, BTC2A6_POR.

A expressão de hSULT1A1 nos transformantes BTC2A6_SULT1A1_POR foi analisada e semi-quantificada por imunodeteção (secção II.2.9). Todos os transformantes apresentaram uma forte expressão da enzima hSULT1A1 (~34 kDa) (figura III. 5).

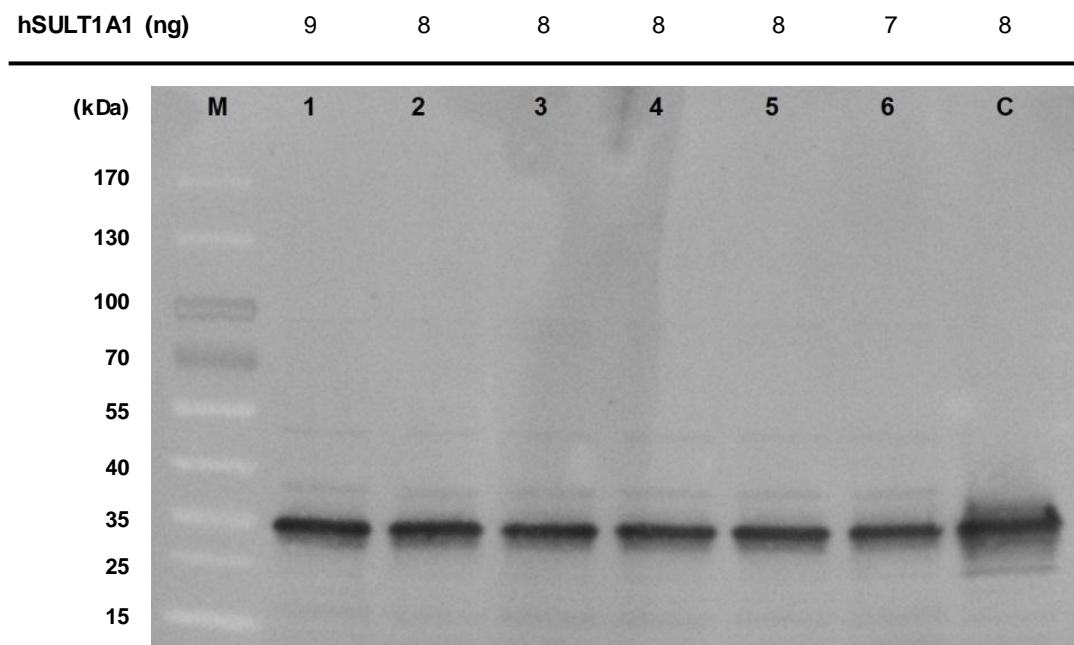


Figura III.5 - Imunodeteção de hSULT1A1 presente nos transformantes de BTC2A6_SULT1A1_POR. M, marcador de pesos moleculares; 1 – 6, transformantes 1 – 6; C, controlo (proteína hSULT1A1 semi-pura). As amostras das culturas foram normalizadas para uma densidade celular DO_{600} 5.

Com base nos critérios apresentados (secções III.1.2.1 – III.1.2.3), seleccionou-se o transformante 5 de BTC2A6_SULT1A1_POR pois, satisfazia a conjugação de critérios mais adequada.

III.1.3 Ensaios de mutagenicidade com a estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR, utilizando o composto padrão 1-MP

Construída a estirpe teste de mutagenicidade, BTC2A6_SULT1A1_POR, competente nos dois sistemas de biotransformação, CYP2A6 e SULT1A1 humanos, efectuaram-se ensaios de mutagenicidade com o composto 1-metilpireno (1-MP), utilizando o ensaio de pré-incubação líquida descrito por Kranendonk e colaboradores (1998).

O pro-mutagénio 1-MP (em anexo, figura VI.6) é um hidrocarboneto aromático policíclico que se demonstrou ser hidroxilado por várias formas de CYP humano (1A1, 1A2, 2A6, 2E1 e 3A4) ao álcool benzílico, 1-hidroximetilpireno (1-HMP) (Engst *et al.*, 1999), o qual foi demonstrado ser bioactivado a um mutagénio através de sulfatação mediada por hSULT1A1 (Meinl *et al.*, 2002). Por ser metabolizado por hidroxilação benzílica (CYP2A6) e subsequente sulfatação (SULT1A1), 1-MP foi escolhido como composto de validação para a estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR.

Em repetidos ensaios de mutagenicidade, 1-MP não apresentou resposta mutagénica na estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR (dados não apresentados).

III.2 Desenvolvimento de estirpes competentes em SULT1A1 humana

As condições de crescimento e procedimento aplicados nos testes de mutagenicidade com a estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR foram os descritos por Kranendonk *et al.* (1998). Uma vez que, as estirpes BTC-CYP do nosso laboratório se encontram bem caracterizadas quanto à actividade de CYP nestas condições, postulou-se que as mesmas não fossem favoráveis a uma actividade óptima de SULT na bioactivação de mutagénios químicos.

Com o objectivo de investigar a causa da incapacidade da estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR para detectar mutagenicidade, desenvolveram-se estirpes de *S. typhimurium* e de *E. coli*, unicamente competentes em hSULT1A1 (secções III.2.2), e estabeleceu-se uma estratégia com quatro abordagens: 1) condições de cultura e procedimento aplicado nos ensaios de mutagenicidade, 2) tipo de alvo genético da estirpe, 3) sensibilidade de *S. typhimurium* vs *E. coli*, e 4) disponibilidade celular de PAPS.

Numa primeira fase (secção III.2.3), construíram-se as estirpes TA1535_pKKSULT1A1 e TA1538_pKKSULT1A1 e mimetizou-se o procedimento aplicado nos ensaios de mutagenicidade descrito por Meinel *et al.* (2002), utilizando 1-HMP como composto padrão. As estirpes de Ames TA1535 e TA1538 diferem geneticamente apenas quanto ao evento de reversão na sequência alvo: TA1535 possui um alvo sensível para detectar mutagenicidade por substituição de bases, enquanto, TA1538 detecta mutagénios que induzem preferencialmente mutações *frameshift* (Mortelmans e Zeiger, 2000). Por repetibilidade de resultados, verificou-se a sensibilidade da estirpe TA1538_pKKSULT1A1 na detecção de mutagenicidade induzida por 1-HMP. Por conseguinte, estandardizou-se o procedimento.

Tal como as estirpes derivadas de TA1535, as estirpes derivadas de BTC apresentam um alvo genético (*argE3*) que reverte a auxotrofia através de mutações por substituição de bases (Kranendonk *et al.*, 1994). No entanto, a reversão à prototrofia por arginina pode ocorrer por todas as transições e transversões possíveis, ao invés de estirpes derivadas de TA1535, que revertem o alvo genético à forma *wild-type* por mutagénios que causam preferencialmente substituição de pares de bases num dos pares GC (Kranendonk *et al.*, 1994). Outra diferença fundamental entre as duas estirpes é a presença do sistema de reparação *error-prone*, codificado pelo operão *mucAB*, presente na estirpe BTC. Para comparar a sensibilidade de detecção de mutagenicidade entre as mencionadas estirpes, BTC_SULT1A1 foi ensaiada com 1-HMP (secção III.2.4).

Num passo subsequente (secção III.2.5), com o objectivo de aproximar as estirpes de *S. typhimurium* de Ames à estirpe BTC, no que respeita à presença do operão *mucAB*, foram construídas as estirpes TA1535_pLCMSULT1A1 e TA1538_pLCMSULT1A1, e testou-se a sua sensibilidade.

Por último (secções III.3.3 e III.3.4), considerando a hipótese de que PAPS seria o factor limitante da actividade de SULT, e por conseguinte, responsável pela insensibilidade da estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR a 1-MP, construíram-se as estirpes TA1535_pLCMSULT1A1_cys e TA1538_pLCMSULT1A1_cys. Estas estirpes têm a particularidade de sobre-expressar o operão *cysDNC*, codificante de enzimas envolvidas na síntese do cofactor PAPS.

A estratégia de trabalho utilizada para testar as hipóteses explicativas da insensibilidade da estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR ao mutagénio padrão 1-MP, encontra-se representada na figura III.6.

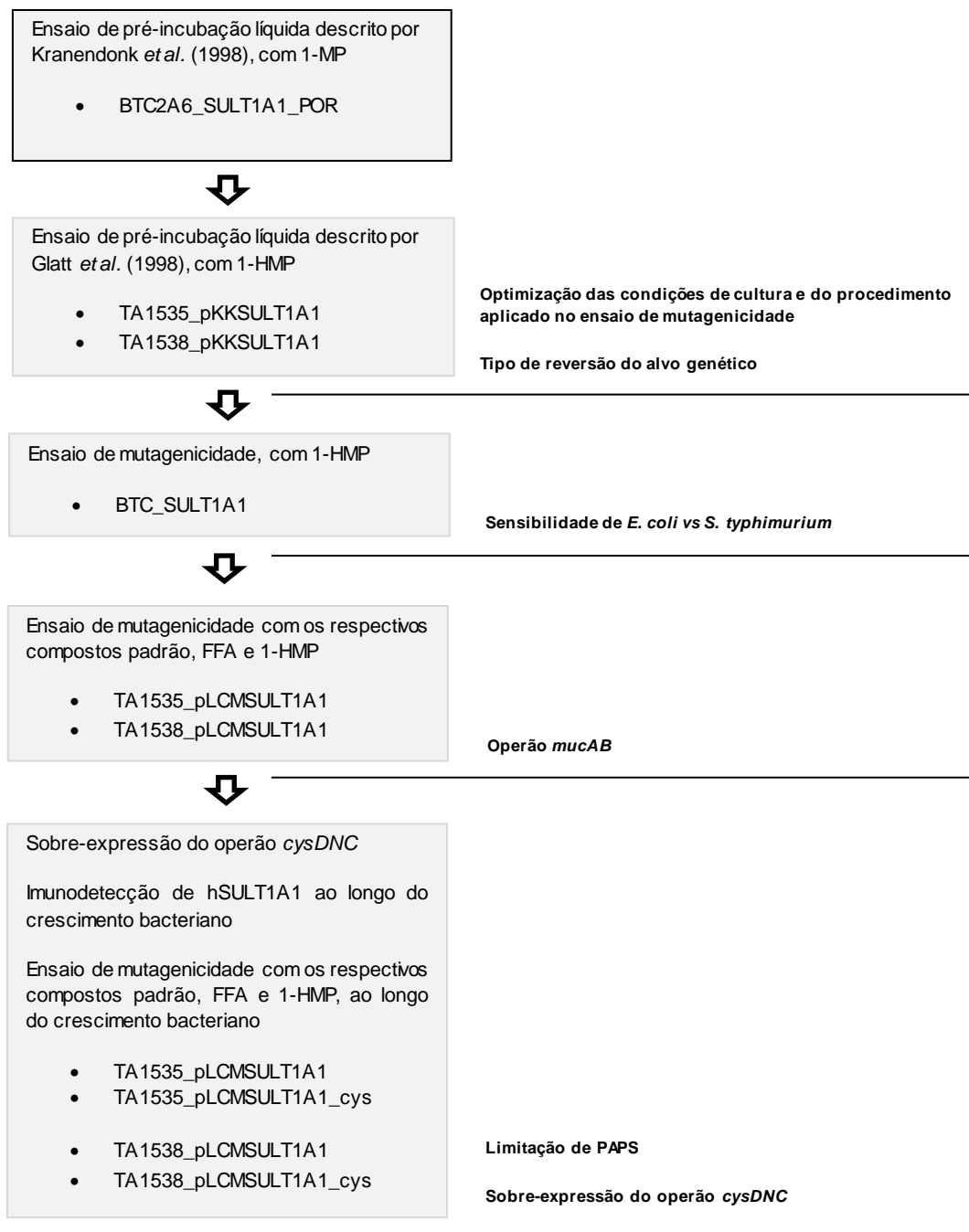


Figura III.6 – Diagrama sobre a estratégia de trabalho para testar as hipóteses explicativas da insensibilidade da estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR a 1-MP.

III.2.1 Construção do plasmídeo pLCM_hSULT1A1

O plasmídeo pLCM_hSULT1A1 (figura III.7) foi construído por clonagem do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y no vector pLCM (em anexo, secção VI.4), utilizando *Sall* e *XbaI* como enzimas de restrição. A inserção deste fragmento foi confirmada por linearização do plasmídeo com *Eco81I*. Por análise do produto da digestão em gel de agarose, confirmou-se a presença de uma banda com aproximadamente 7100 pb, nos transformantes portadores do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y (transformantes 2, 3, 5, e 6) (figura III.8). Após sequenciação e análise do fragmento pTAC_SULT1A1*1Y dos transformantes 2, 3, 5, e 6, seleccionou-se o DNA plasmídico com a melhor qualidade de sequenciação (transformante 2).

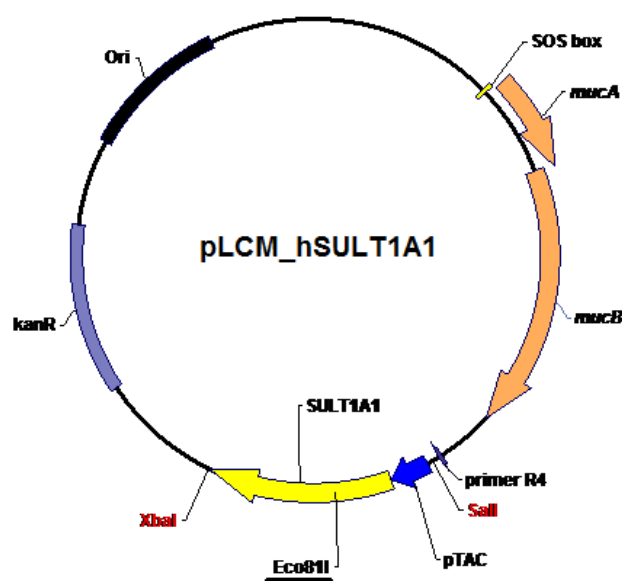


Figura III.7 – Representação esquemática do plasmídeo pLCM_hSULT1A1 (7093 pb). O local de restrição da enzima *Eco81I* (posição 3441) encontra-se sublinhado a preto.

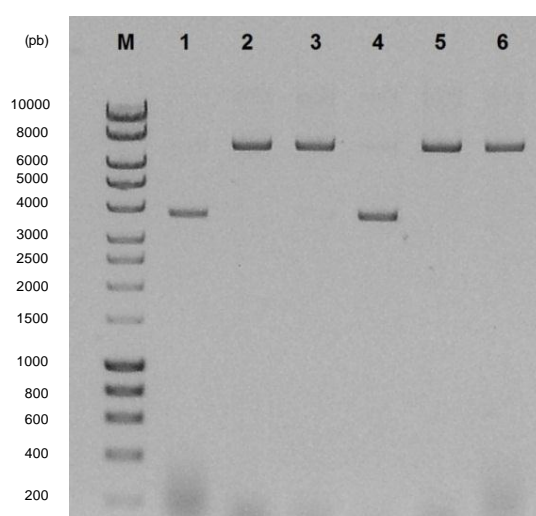


Figura III.8 – Electroforese em gel de agarose, dos produtos de digestão do DNA plasmídico de 6 transformantes, com a enzima de restrição *Eco81I*. M, fragmentos de DNA linear (marcador); 1 – 6, transformantes 1 - 6.

III.2.2 Construção de estirpes de *S. typhimurium* e de *E. coli* competentes SULT1A1 humana

III.2.2.1 Transformação das estirpes TA1535, TA1538 e PD301, confirmação das características fenotípicas das estirpes, e análise do DNA plasmídico

A construção das estirpes TA1535_pKKSULT1A1 e TA1538_pKKSULT1A1 fez-se por transformação das estirpes, TA1535 e TA1538 (tabela II.4), com o plasmídeo pKK233-2_SULT1A1 (tabela II.5).

Para construir as estirpes TA1535_pLCMSULT1A1, TA1538_pLCMSULT1A1 e BTC_SULT1A1, as respectivas estirpes-mãe, TA1535, TA1538 e PD301 (tabela II.4), foram transformadas simultaneamente com os plasmídeos pCWA Δ e pLCM_hSULT1A1 (tabela II.5). O plasmídeo pCWA Δ codifica para o repressor LacI^q, possibilitando uma expressão regulada de hSULT1A1. O plasmídeo pLCM_hSULT1A1 possui o operão *mucAB*, importante para uma sensibilidade aumentada das estirpes (figura III.7).

Todos os transformantes apresentaram auxotrofia para L-his (TA1535 e TA1538) ou para L-arg (PD301) em placas selectivas M9 (secção II.2.6.1). A existência de LPS^d foi confirmada pela ausência de crescimento em placas contendo meio agar MacConkey (secção II.2.6.2). A coexistência estável dos plasmídeos foi confirmada por electroforese (dados não apresentados).

III.2.2.2 Avaliação da sensibilidade das estirpes TA1535_pKKSULT1A1, TA1538_pKKSULT1A1, TA1535_pLCMSULT1A1, TA1538_pLCMSULT1A1 e BTC_SULT1A1 na detecção de mutagenicidade, sem expressão heteróloga de SULT1A1 humano

Com o objectivo de confirmar a sensibilidade das estirpes TA1535_pKKSULT1A1 e TA1535_pLCMSULT1A1 na detecção de mutagenicidade, sem expressão heteróloga de hSULT1A1 (II.2.7), todos os transformantes (1 - 6) e a estirpe controlo, TA100, foram testados com o mutagénio padrão 4-NQO (0,5 μ g/placa). Este mutagénio foi o seleccionado, por apresentar padrões de reversão bem caracterizados na estirpe TA100 (Maron e Ames, 1983). A utilização desta estirpe como controlo deve-se ao facto de ser geneticamente idêntica à estirpe TA1535 (estirpe-mãe de TA1535_pKKSULT1A1 e TA1535_pLCMSULT1A1), à excepção do plasmídeo pKM101 (contendo o operão *mucAB*) (tabelas II.4 e II.5).

Para confirmar a sensibilidade de reversão dos transformantes das estirpes TA1538_pKKSULT1A1 e TA1538_pLCMSULT1A1, na detecção de mutagenicidade, todos os transformantes (1 - 6) e a estirpe controlo, TA98, foram testados com uma dose de 0,3 μ g/placa do composto 4-nitro-o-fenilenediamina (NPD). Este mutagénio foi escolhido por se encontrar descrito como mutagénio padrão em estirpes contendo mutações *frameshift* no alvo genético (Maron e Ames, 1983). A estirpe TA98 foi utilizada como estirpe controlo uma vez que é geneticamente idêntica à estirpe TA1538 (estirpe-mãe de TA1538_pKKSULT1A1 e TA1538_SULT1A1), no entanto, portadora do plasmídeo pKM101 (tabelas II.4 e II.5).

A confirmação da sensibilidade da estirpe BTC_SULT1A1 na detecção de mutagenicidade fez-se, utilizando 4-NQO (0,15 µg/placa), como referido anteriormente (secção III.1.2). A estirpe BTC⁰ (tabela II.4), sem DNA plasmídico codificante de SULT1A1h (tabela II.5), foi utilizada como controlo.

A selecção do transformante pretendido de cada estirpe foi baseada nos critérios descritos na secção III.2.2.1 e na presente secção, III.2.2.2, em conjunto (dados não apresentados).

III.2.3 Sensibilidade na detecção de mutagenicidade de 1-HMP, dependente do tipo de mutação do alvo genético e procedimento

Realizaram-se testes de mutagenicidade com 1-HMP (em anexo, figura VI.6) para analisar a sensibilidade das estirpes TA1535_pKKSULT1A1 e TA1538_pKKSULT1A1 na bioactivação de 1-HMP, dependente do alvo genético (figura III.9), utilizando o procedimento descrito por Meini *et al.* (2002). A actividade mutagénica de 1-HMP obtida com a estirpe TA1538_pKKSULT1A1 foi 10474 ± 29 revertentes/nmol, próxima da descrita no mesmo estudo (14000 revertentes/nmol 1-HMP). Assim, confirmou-se a efectividade do procedimento. Por parte da estirpe TA1535_pKKSULT1A1, não se obteve resposta mutagénica até uma dose de 3 µg de 1-HMP por placa. Estes dados indicaram que 1-HMP induz preferencialmente mutações do tipo *frameshift*.

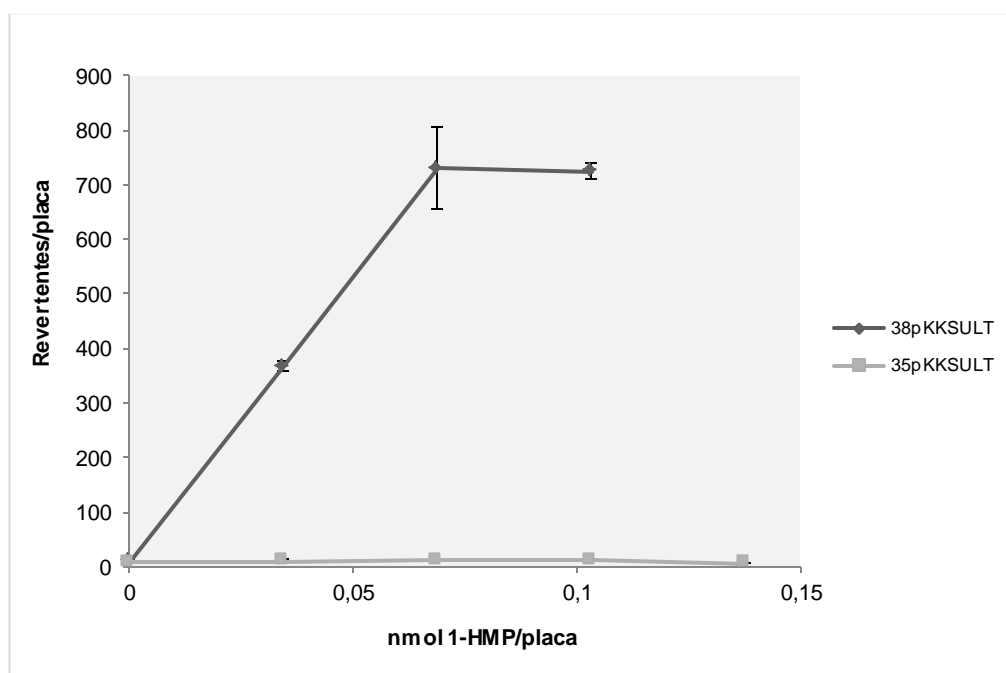


Figura III.9 – Curva dose-resposta do composto 1-HMP, obtida com as estirpes TA1535_pKKSULT1A1 e TA1538_pKKSULT1A1.

Por manipulação das condições de cultura, e por repetibilidade de resultados, observou-se o aumento da actividade mutagénica de 1-HMP, obtido com a estirpe TA1538_pKKSULT1A1, em condições de menor arejamento. Por este motivo, a utilização de Erlenmeyers (250 mL) no crescimento de culturas foi substituída por tubos de 100 x 16 mm.

III.2.4 Ensaio de mutagenicidade com a estirpe de *E. coli* BTC_SULT1A1, utilizando 1-HMP como composto padrão

Com o objectivo de comparar a sensibilidade da estirpe BTC_SULT1A1 de *E. coli* e de TA1535_pKKSUL1A1 de *S. typhimurium*, ambas portadoras de um alvo genético que reverte preferencialmente por substituição de bases (*hisG46/hisD3052* e *argE3*, respectivamente), realizaram-se testes de mutagenicidade com a estirpe BTC_SULT1A1, utilizando 1-HMP como composto padrão (figura III.10). Ao contrário da estirpe TA1535_pKKSUL1A1, a estirpe BTC_SULT1A1 mostrou sensibilidade na detecção de mutagenicidade de 1-HMP, o qual apresentou uma actividade mutagénica de 37 ± 6 revertentes/nmol.

A diferença de sensibilidade de detecção da mutagenicidade de 1-HMP entre TA1535_pKKSUL1A1 e BTC_SULT1A1 pode ter como explicação, a presença do operão *mucAB* no plasmídeo pLCM_hSULT1A1, e o facto de estirpes teste de mutagenicidade BTC detectarem substituições de bases incluindo todas as transições e transversões (nas bases ATCG) (Kranendonk *et al.*, 1994), enquanto estirpes de *S. typhimurium* derivadas de TA1535, detectam apenas mutações por substituição nas bases CG (Maron e Ames, 1983).

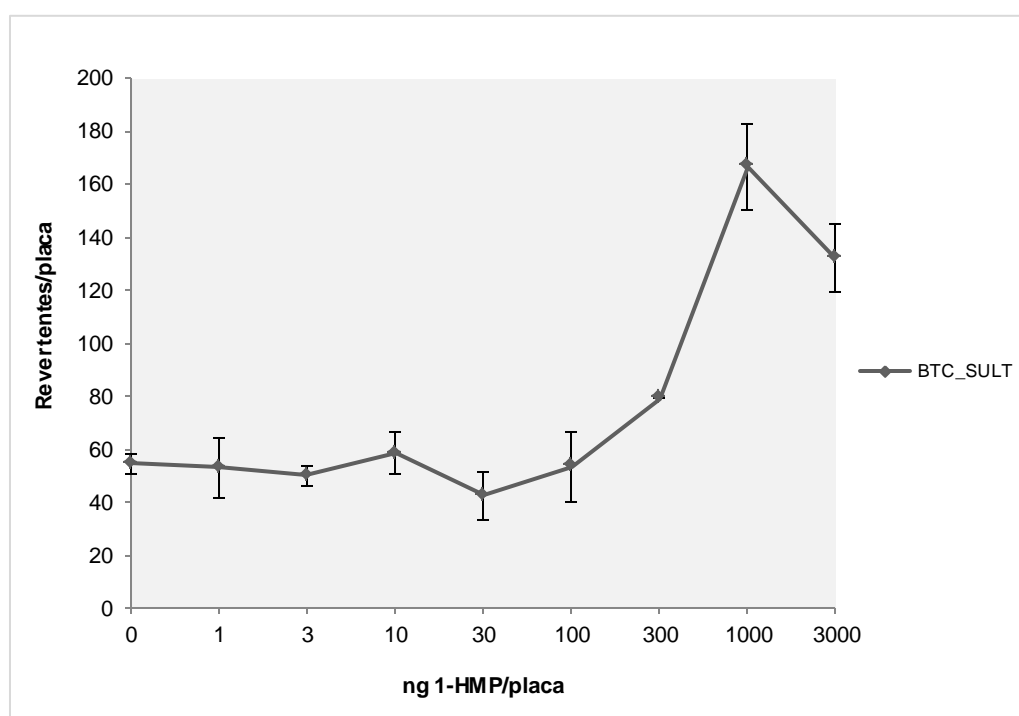


Figura III.10 - Curva dose-resposta do composto 1-HMP, obtida com a estirpe BTC_SULT1A1.

III.2.5 Ensaios de mutagenicidade com estirpes de *S. typhimurium*, contendo o sistema bioplasmídico pCWAΔ/pLCM_hSULT1A1

Para confirmar que a presença do sistema bioplasmídico pCWAΔ/pLCM_hSULT1A1 aumenta a sensibilidade de detecção de mutagenicidade das estirpes derivadas de TA1535 e TA1538 competentes em hSULT1A1, realizaram-se ensaios de mutagenicidade com as estirpes TA1538_pLCMSULT1A1 e TA1535_pLCMSULT1A1. A estirpe TA1538_pLCMSULT1A1 foi testada (figura III.11) com 1-HMP e obteve-se uma actividade mutagénica (28173 ± 1938 revertentes/nmol 1-HMP), aproximadamente 3 vezes superior ($p < 0,0001$) à obtida na estirpe TA1538_pKKSULT1A1 (10474 ± 29 revertentes/nmol 1-HMP). Como controlo negativo utilizou-se a estirpe TA98, isogénica da TA1538, mas portadora do plasmídeo pKM101 (contendo o operão *mucAB*), sem expressão de hSULT1A1 (tabelas II.4 e II.5). Com esta estirpe não foi possível demonstrar a mutagenicidade do composto 1-HMP.

A estirpe TA1535_pLCMSULT1A1 foi testada (figura III.12) com o composto padrão furfuril álcool (FFA) (em anexo, figura VI.6), álcool benzílico descrito como mutagénico em estirpes *S. typhimurium* TA100/pKK_hSULT1A1, expressando a forma SULT1A1 humana (Glatt *et al.*, 2012). Como controlo negativo, utilizou-se a estirpe TA100, isogénica de TA1535, mas portadora do plasmídeo pKM101 (contendo o operão *mucAB*), sem expressão de hSULT1A1 (tabelas II.4 e II.5). Com esta estirpe não foi possível demonstrar a mutagenicidade do composto FFA.

A actividade mutagénica de FFA obtida na estirpe TA1535_pLCMSULT1A1 (21033 ± 1168 revertentes/ μ mol FFA), foi aproximadamente 12 vezes superior à da estirpe TA100/pKK_hSULT1A1 desenvolvida por Glatt *et al.* (2012) (1800 revertentes/ μ mol FFA).

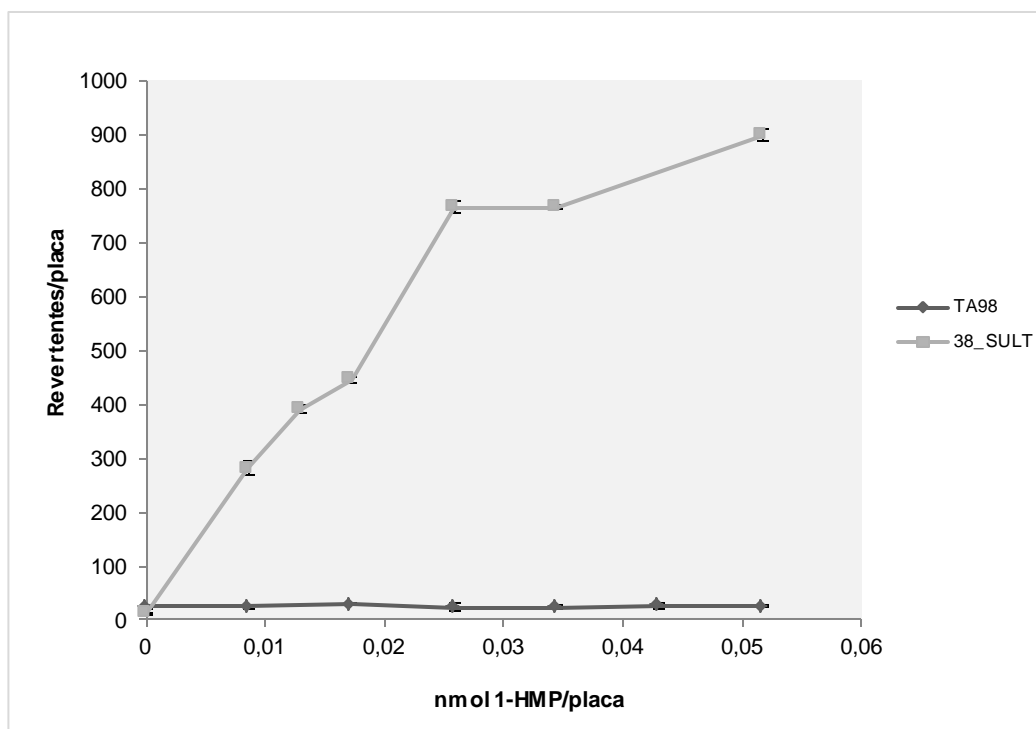


Figura III.11 – Curva dose-resposta do composto 1-HMP, obtida com as estirpes TA1538_SULT1A1 e TA98.

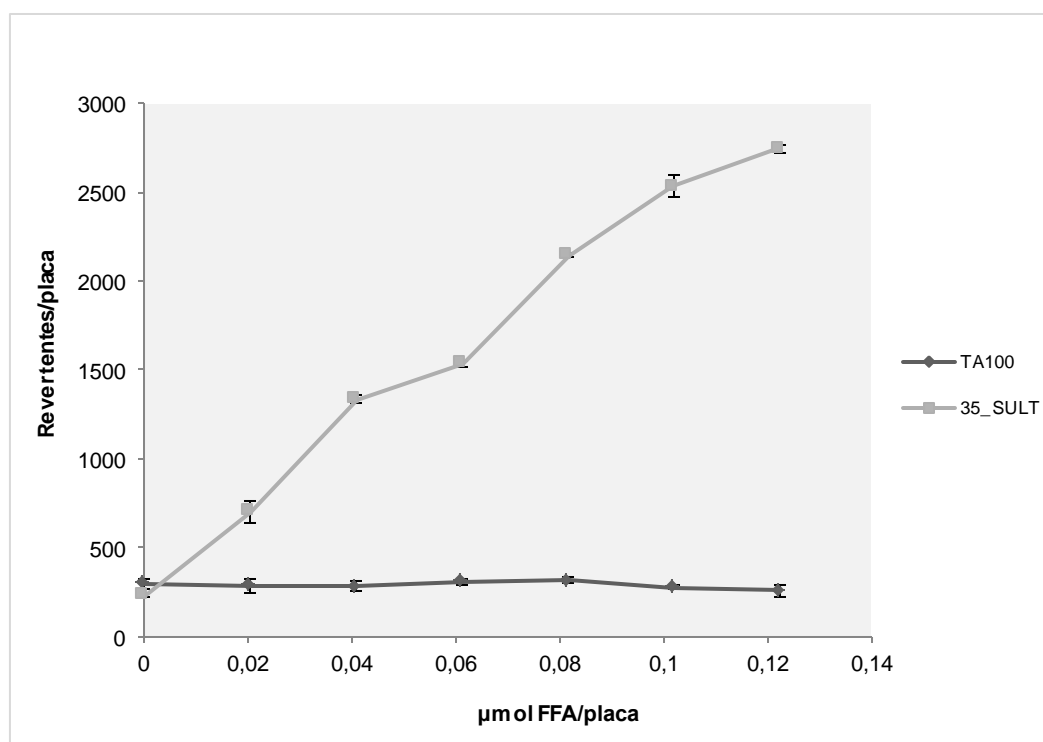


Figura III.12 – Curva dose-resposta de FFA, obtida com as estirpes TA1535_SULT1A1 e TA100.

III.3 Desenvolvimento de estirpes competentes em SULT1A1 humana, com sobre-expressão de *cysDNC*

O procedimento de pré-incubação líquida utilizado por Glatt e colaboradores (1998), em fase de crescimento muito precoce, relativamente ao procedimento do teste de Ames, foi um forte indicador de que SULT seria mais activo nesta fase.

Em experiências preliminares de imunodeteção foi mostrado que hSULT1A1 se encontra relativamente bem expressa desde fases de crescimento iniciais (dados não apresentados). Assim, sendo PAPS cofactor obrigatório de SULT, suspeitou-se que o mesmo pudesse constituir o factor limitante na actividade de SULT, limitando também a sensibilidade da estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR na detecção de mutagenicidade. Para ultrapassar esta limitação, procedeu-se à clonagem do operão *cysDNC* no plasmídeo pLCM_hSULT1A1. Este operão está contido no DNA cromossomal de *E. coli* e de *S. typhimurium* (Leyh *et al.*, 1988), sendo responsável pela codificação de duas importantes enzimas envolvidas na síntese de PAPS, ATP sulfúrilase e APS cinase (secção I.2.1.1).

III.3.1 Construção do plasmídeo pLCM_hSULT1A1_cys

Para construir o plasmídeo pLCM_hSULT1A1_cys, clonou-se o fragmento *cysDNC* (obtido por PCR do DNA genómico de *E. coli*) a 3' do cDNA codificante de hSULT1A1 (figura III.13), no vector pLCM_hSULT1A1 (figura III.7), ambos previamente digeridos com a enzima de restrição *XbaI*. A inserção correcta do fragmento *cysDNC* foi verificada por digestão enzimática com as enzimas *XbaI* e *DraI* (figura III.14). Uma vez que a enzima *XbaI* é sensível a metilações *dam*, e que o local de reconhecimento desta enzima situado na posição 7012 é seguido por uma metilação, obtiveram-se apenas duas bandas após electroforese. Nos transformantes 1 e 6 observaram-se duas bandas aproximadamente com 9000 pb e 1000 pb e, nos transformantes 2 a 5, obtiveram-se duas bandas aproximadamente com 7000 bp e 3000pb. Estes resultados demonstraram que os transformantes 1 e 6 incorporaram o fragmento na orientação oposta, e os transformantes 2 a 5, na orientação pretendida. Após sequenciação e análise do fragmento *cysDNC* dos transformantes 2 a 5, seleccionou-se o DNA plasmídico do transformante com a melhor qualidade de sequenciação, confirmando a clonagem de *cysDNC* (transformante 2).

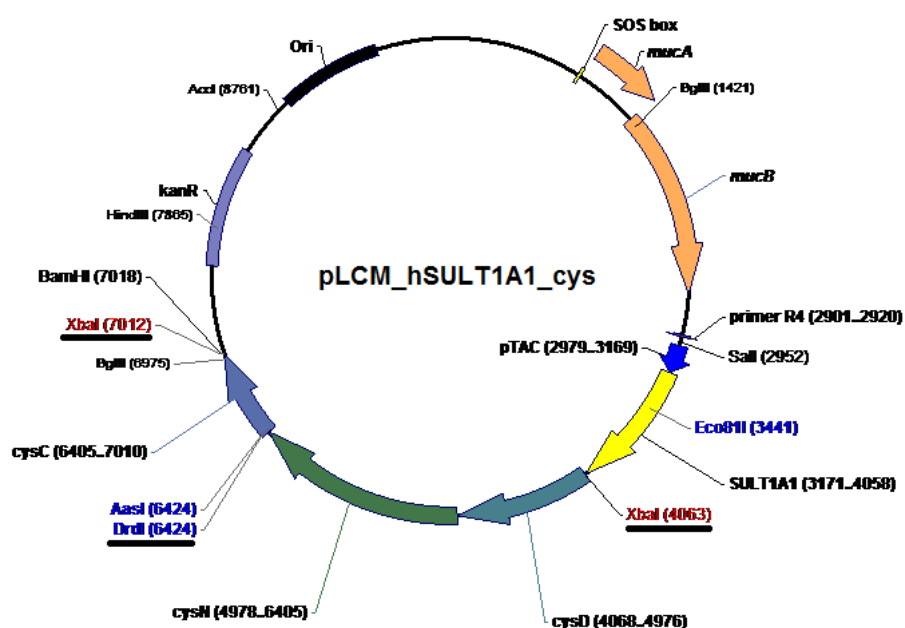


Figura III.13 – Representação esquemática do plasmídeo pLCM_hSULT1A1_cys (10142 pb). Os locais de restrição das enzimas *XbaI* (posição 4063 e 7012) e *DraI* (posição 6424) encontram-se sublinhados a preto.

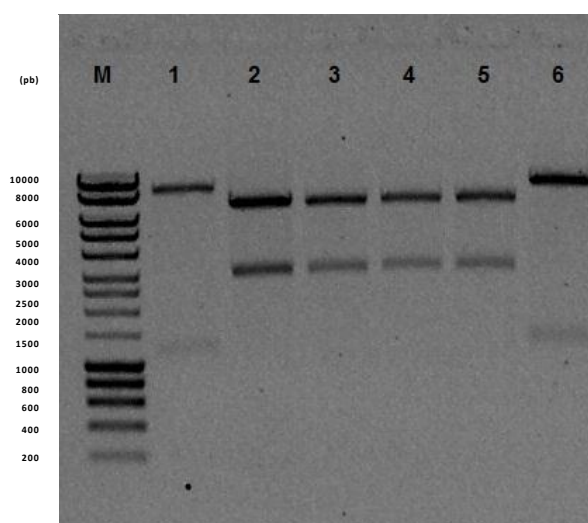


Figura III.14 – Eletroforese em gel de agarose, dos produtos de digestão do DNA plasmídico, contendo o fragmento *cysDNC*, de 6 transformantes, com as enzimas de restrição *XbaI* e *DraI*. M, fragmentos de DNA linear (marcador); 1 – 6, transformantes 1 - 6.

III.3.2 Construção da estirpe de *S. typhimurium* TA1535_pLCMSULT1A1_cys e TA1538_pLCMSULT1A1_cys, competentes em SULT1A1 humana, com sobre-expressão de *cysDNC*

III.3.2.1 Transformação das estirpes TA1535 e TA1538, confirmação das características fenotípicas das estirpes, e análise do DNA plasmídico

As estirpes TA1535 e TA1538 foram transformadas com os plasmídeos pCWA Δ e pLCM_hSULT1A1_cys, obtendo-se as estirpes TA1535_pLCMSULT1A1_cys e TA1538_pLCMSULT1A1_cys (tabelas II.4 e II.5). A auxotrofia por L-his verificou-se em todos os transformantes e a mutação *rfa*⁻ confirmou-se por procedimentos anteriormente mencionados (secções II.2.6.1 e II.2.6.2). A coexistência estável dos plasmídeos foi confirmada por electroforese (secção II.2.3.1) (dados não apresentados).

III.3.2.2 Avaliação da sensibilidade das estirpes TA1535_pLCMSULT1A1_cys e TA1538_pLCMSULT1A1_cys na detecção de mutagenicidade, sem expressão heteróloga

Os transformantes TA1535_pLCMSULT1A1_cys e TA1538_pLCMSULT1A1_cys foram testados com os mutagénios diagnóstico 4-NQO (0,5 μ g/placa) e NPD (0,3 μ g/placa), respectivamente, para confirmar a sensibilidade das estirpes na detecção de mutagenicidade, sem expressão heteróloga de hSULT1A1 (II.2.7). Como controlo negativo utilizaram-se as estirpes TA100 (para testar a sensibilidade da estirpe TA1535_SULT1A1_cys) e TA98 (para testar a sensibilidade da estirpe TA1538_SULT1A1_cys).

A selecção do transformante pretendido para cada uma das estirpes foi baseada nos critérios descritos na secção III.3.2.1 e na presente secção, III.3.2.2, em conjunto (dados não apresentados).

III.3.3 Ensaios de imunodeteção de hSULT1A1 e de mutagenicidade, em função da fase de crescimento

Para determinar o efeito da fase de crescimento bacteriano, com e sem sobre-expressão de *cysDNC*, das estirpes TA1535_pLCMSULT1A1, TA1535_pLCMSULT1A1_cys, TA1538_pLCMSULT1A1 e TA1538_pLCMSULT1A1_cys, analisaram-se dois parâmetros em várias fases de crescimento de cultura: 1) expressão de hSULT1A1 e 2) resposta mutagénica das estirpes aos respectivos compostos padrão, dependente de hSULT1A1 (figuras III.15 - 18).

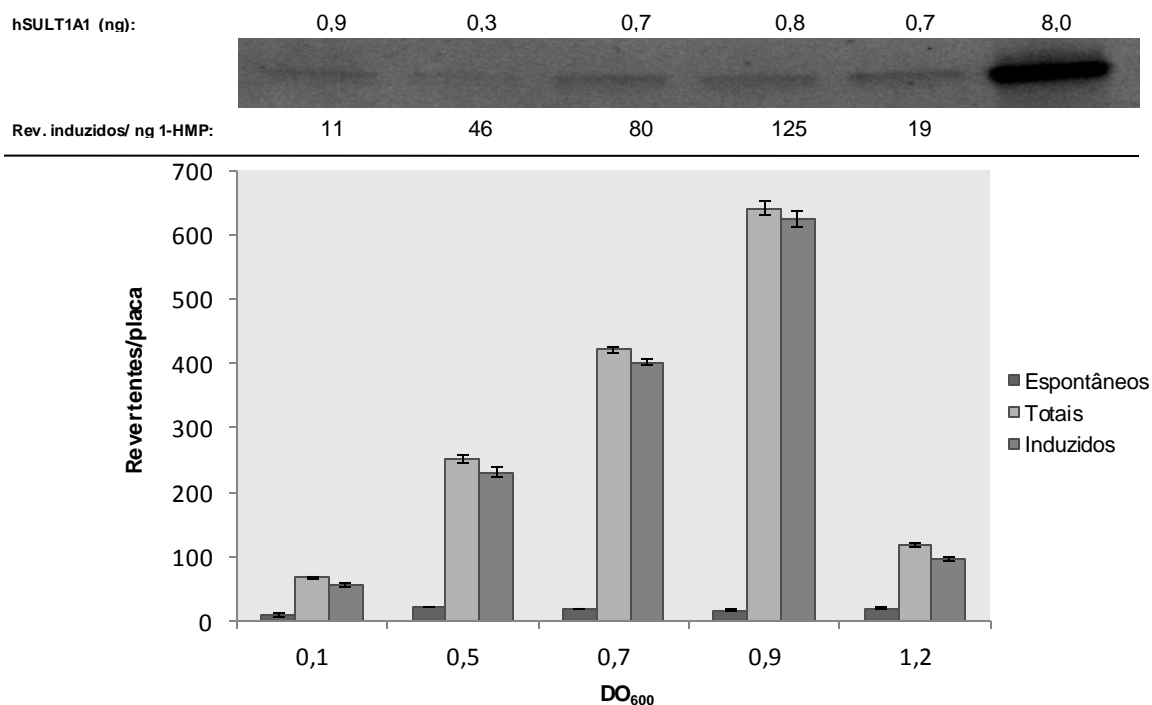


Figura III.15 – Actividade mutagénica de 1-HMP (5 ng/placa) obtida com a estirpe TA1538_pLCMSULT1A1, em várias fases de crescimento. As bandas obtidas por imunodeteção de hSULT1A1 nas correspondentes densidades de cultura, encontram-se dispostas acima do gráfico. A banda mais à direita corresponde à amostra controlo. As amostras das culturas foram normalizadas para uma densidade celular DO₆₀₀ 10.

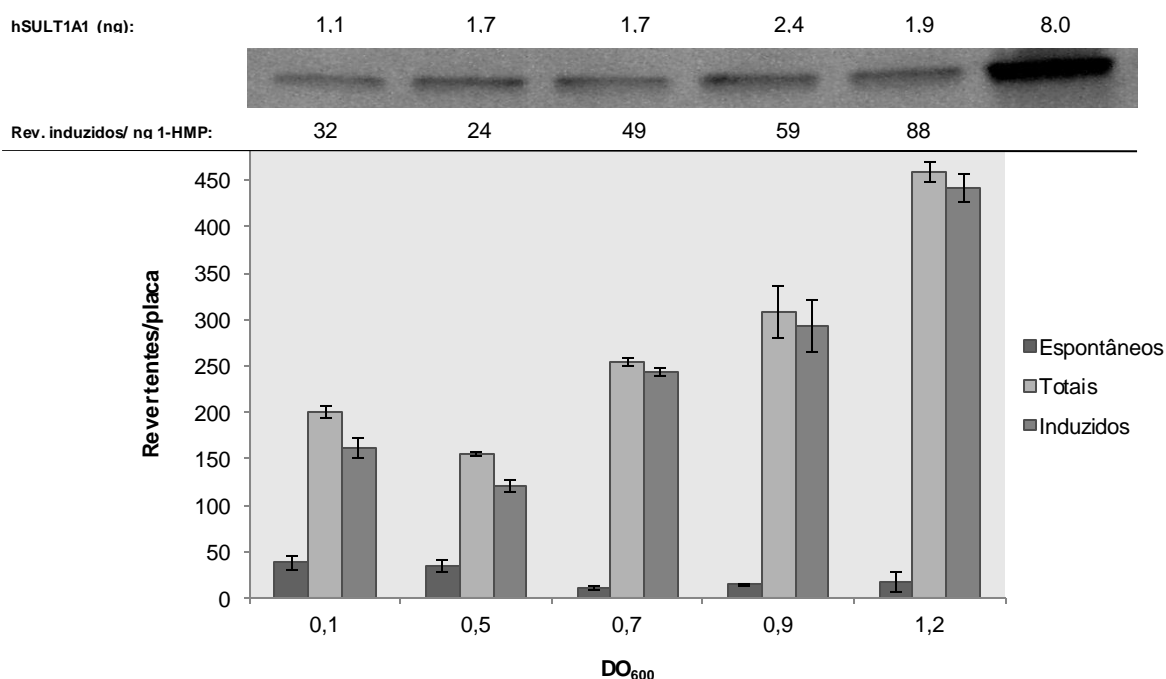


Figura III.16 – Actividade mutagénica de 1-HMP (5 ng/placa) obtida com a estirpe TA1538_pLCMSULT1A1_cys, em várias fases de crescimento. As bandas obtidas por imunodeteção de hSULT1A1 nas correspondentes densidades de cultura, encontram-se dispostas acima do gráfico. A banda mais à direita corresponde à amostra controlo. As amostras das culturas foram normalizadas para uma densidade celular DO₆₀₀ 10.

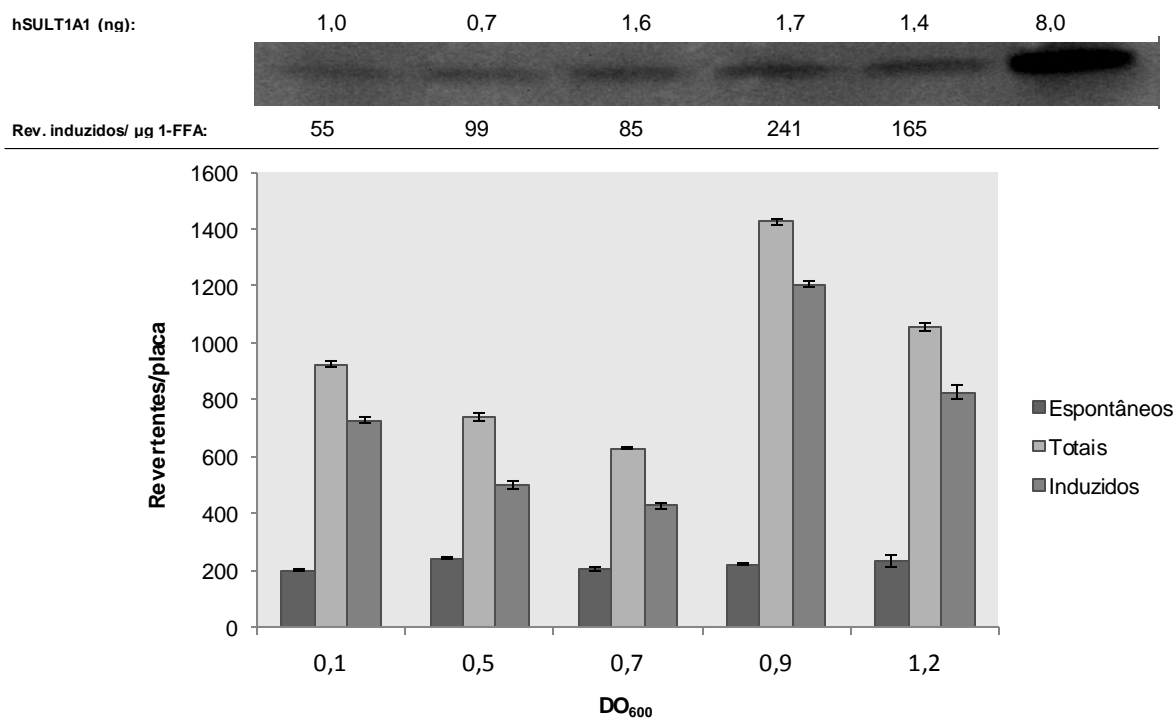


Figura III.17 – Actividade mutagénica de FFA (5 μ g/placa) obtida com a estirpe TA1535_pLCMSULT1A1, em várias fases de crescimento. As bandas obtidas por imunodeteção de hSULT1A1 nas correspondentes densidades de cultura, encontram-se dispostas acima do gráfico. A banda mais à direita corresponde à amostra controlo. As amostras das culturas foram normalizadas para uma densidade celular DO₆₀₀ 10.

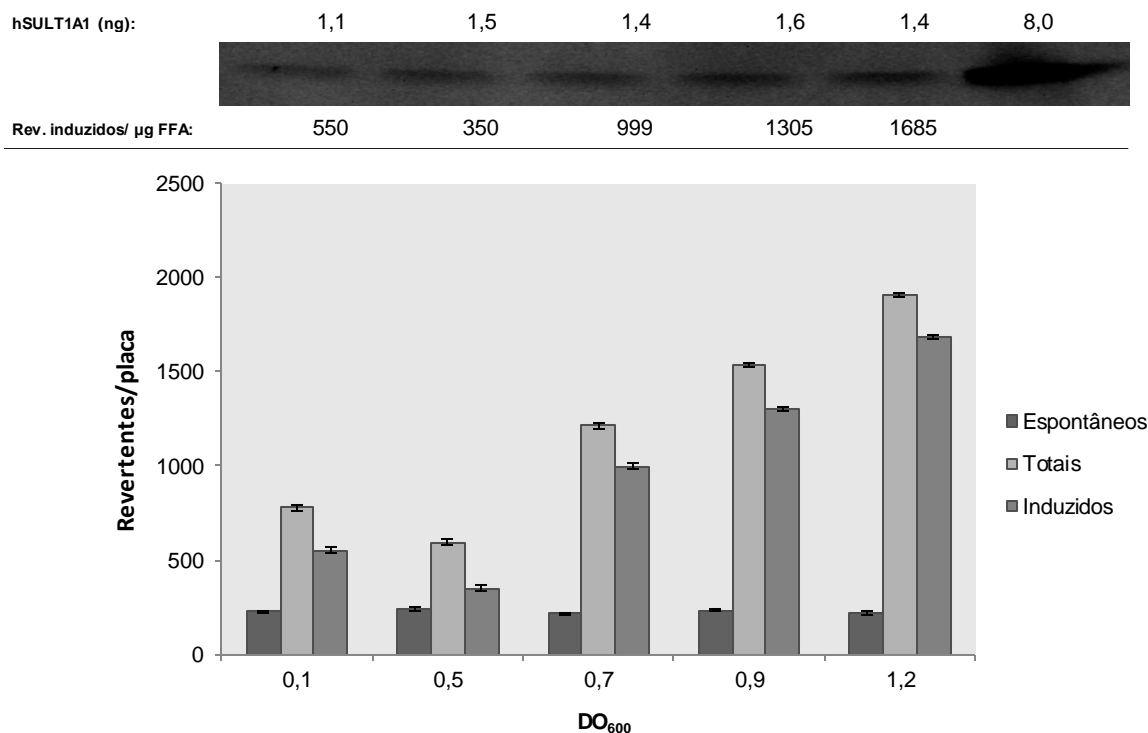


Figura III.18 - Actividade mutagénica de FFA (1 μ g/placa) obtida com a estirpe TA1535_pLCMSULT1A1_cys, em várias fases de crescimento. As bandas obtidas por imunodeteção de hSULT1A1 nas correspondentes densidades de cultura, encontram-se dispostas acima do gráfico. A banda mais à direita corresponde à amostra controlo. As amostras das culturas foram normalizadas para uma densidade celular DO₆₀₀ 10.

Constatou-se que hSULT1A1 é aproximadamente expressa nos mesmos níveis, deste DO_{600} 0,5 a 1,2. Contudo, a resposta mutagénica obtida não foi constante ao longo do crescimento bacteriano. Estirpes sem sobre-expressão do operão *cysDNC*, apresentaram uma quebra significativa na detecção de mutagenicidade, a partir de densidades de cultura superiores a DO_{600} 0,9 (aproximada da utilizada no procedimento de Glatt e colaboradores). Contrariamente, as estirpes sobre-expressando o operão *cysDNC*, apresentaram resposta mutagénica até densidades de cultura superiores. Na estirpe TA1538_pLCMSULT1A1_cys a resposta mutagénica aumentou, aproximadamente, 34% de DO_{600} 0,9 para DO_{600} 1,2; e, na estirpe TA1535_pLCMSULT1A1_cys, o aumento foi de, aproximadamente, 23% no mesmo intervalo de DO_{600} . Deste modo, estandardizaram-se as densidades de cultura aplicadas nos ensaios de mutagenicidade com estirpes sem sobre-expressão de *cysDNC*, para DO_{600} 0,9 e, nos ensaios de mutagenicidade com estirpes sobre-expressando *cysDNC*, estabeleceu-se uma DO_{600} 1,2.

Os resultados obtidos são fortes indicadores de que PAPS constitui um factor limitante da actividade de hSULT1A1, e que esta limitação é atenuada quando *cysDNC* é sobre-expresso nas estirpes teste.

III.3.4 Detecção de mutagenicidade com estirpes sobre-expressando *cysDNC*

Para determinar o efeito da sobre-expressão de *cysDNC* na detecção de mutagenicidade de compostos mutagénicos dependentes de hSULT1A1, com e sem sobre-expressão de *cysDNC*, foram ensaiadas curvas dose-resposta, e calcularam-se as actividades mutagénicas das estirpes derivadas de TA1538 (figura III.19 e tabela III.2) e de TA1535 (figura III.20 e tabela III.3).

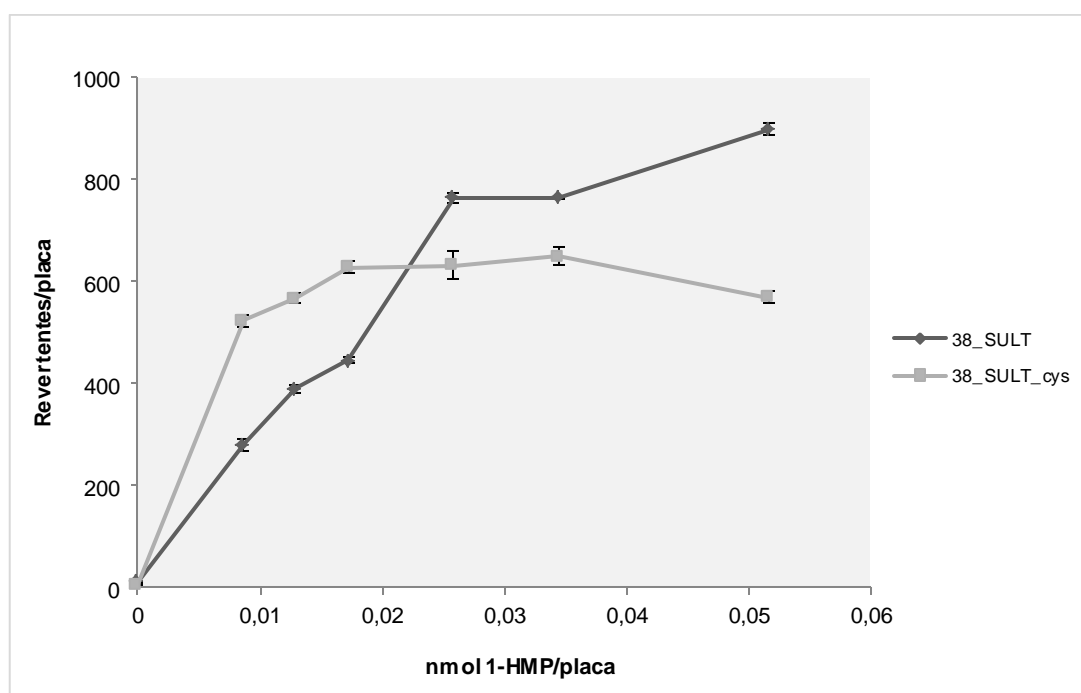


Figura III.19 – Curva dose-resposta do composto 1-HMP, obtida com as estirpes TA1538_pLCMSULT1A1 e TA1538_pLCMSULT1A1_cys.

Tabela III.2 - Actividades mutagénicas do composto 1-HMP.

Composto	Estirpe	Revertentes/nmol
1-HMP	TA1538_pLCMSULT1A1	28173 \pm 1938
	TA1538_pLCMSULT1A1_cys	45726 \pm 12300

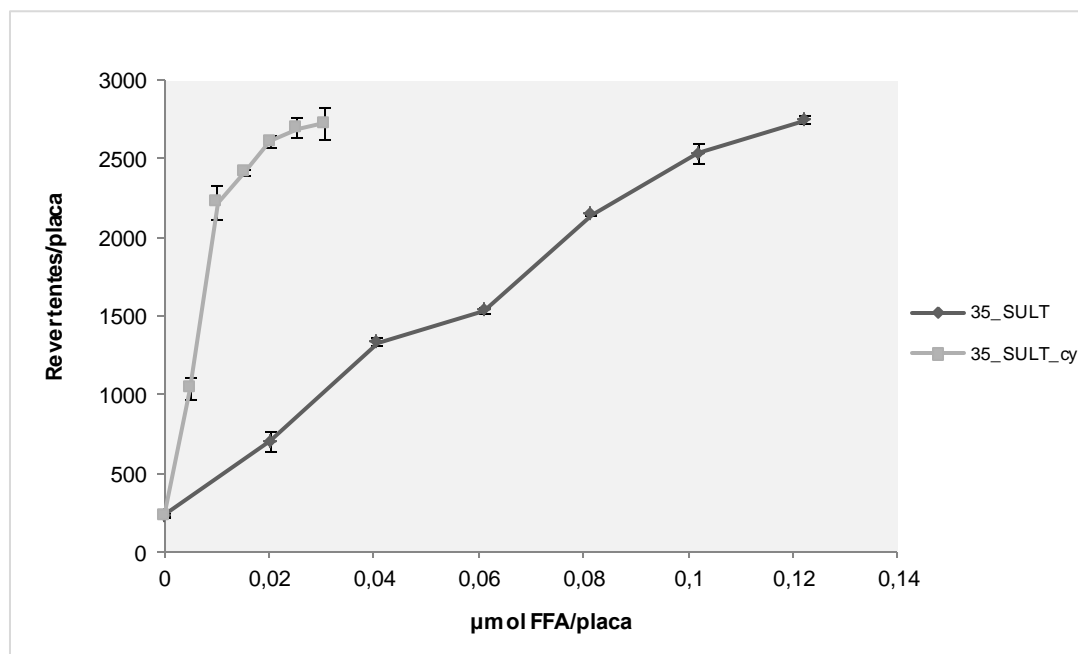


Figura III.20 – Curva dose-resposta do composto FFA, obtida com as estirpes TA1535_pLCMSULT1A1 e TA1535_pLCMSULT1A1_cys.

Tabela III.3 - Actividades mutagénicas do composto FFA.

Composto	Estirpe	Revertentes/µmol
FFA	TA1535_pLCMSULT1A1	21033 \pm 1168
	TA1535_pLCMSULT1A1_cys	151937 \pm 27169

Pelos resultados obtidos, verifica-se que as actividades mutagénicas obtidas com estirpes que sobre-expressam o operão *cysDNC* foram superiores às obtidas nas estirpes das quais derivaram, expressando apenas *hSULT1A1*. O caso mais evidente foi o da estirpe TA1535_pLCMSULT_cys, com a qual foi obtida uma actividade mutagénica de 151937 \pm 27169 revertentes/µmol FFA, aproximadamente 7 vezes superior ($p < 0,0001$) à de TA1535_pLCMSULT (21033 \pm 1168 revertentes/µmol FFA). A estirpe TA1538_pLCMSULT_cys mostrou-se, aproximadamente 2 vezes, mais sensível ($p < 0,05$) na detecção de mutagenicidade de 1-HMP, relativamente à estirpe TA1538_pLCMSULT.

Os dados obtidos reforçam a hipótese de que PAPS seja o factor limitante da actividade de *hSULT1A1* nas estirpes TA1535_pLCMSULT1A1 e TA1538_pLCMSULT1A1 (e possivelmente de BTC2A6_SULT1A1_POR), e que estirpes sobre-expressando enzimas da biossíntese deste cofactor, constituam sistemas com sensibilidade aumentada na detecção de mutagenicidade induzida por compostos bioactivados por SULTs.

III.4 Ensaios de mutagenicidade com 12-hidroxi-NVP

Embora os mecanismos específicos responsáveis pela toxicidade induzida por NVP ainda não estejam clarificados, vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm indicado o envolvimento de SULT na bioativação de 12-hidroxi-NVP, um dos metabolitos de fase I de NVP, a electrófilos reactivos.

Numa fase do estudo em que as condições de cultura e procedimento aplicado no ensaio de mutagenicidade se encontravam optimizados para uma actividade máxima de SULT na bioativação de pro-mutagénios e, após desenvolvimento de estirpes competentes em hSULT1A1, com sensibilidade aumentada, testou-se a mutagenicidade do metabolito 12-hidroxi-NVP nas estirpes: TA1535_pLCMSULT1A1, TA1535_pLCMSULT1A1_cys, TA1538_pLCMSULT1A1 (figura III.21) e TA1538_pLCMSULT1A1_cys (figura III.22).

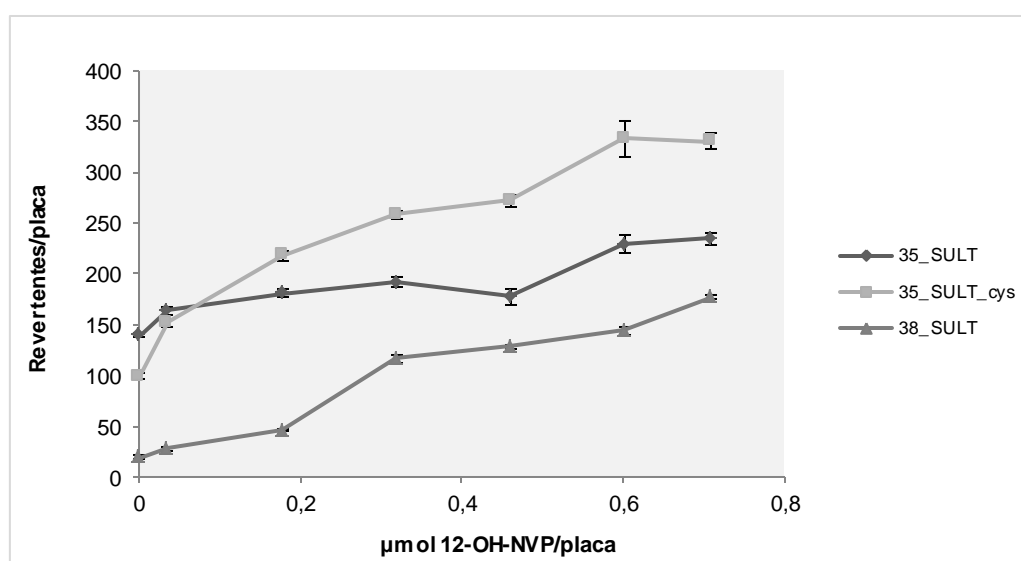


Figura III.21 – Curvas dose-resposta do composto 12-OH-NVP, obtidas com as estirpes TA1535_pLCMSULT1A1, TA1535_pLCMSULT1A1_cys e TA1538_pLCMSULT1A1.

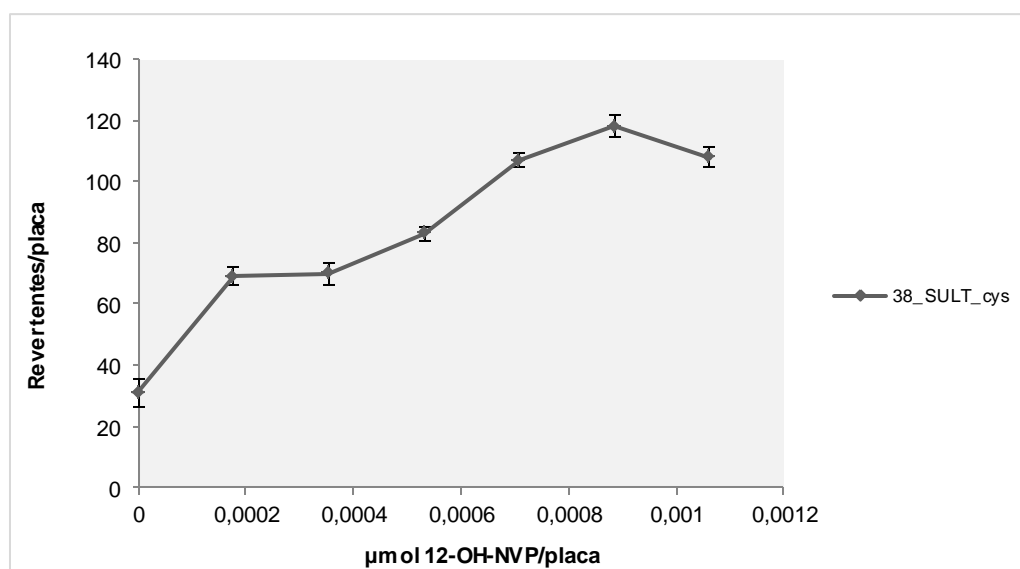


Figura III.22 - Curva dose-resposta do composto 12-OH-NVP, obtida com a estirpe TA1538_SULT1A1_cys.

Tabela III.4 - Actividades mutagénicas do composto 12-OH-NVP.

Composto	Estirpe	Revertentes/ μmol
12-OH-NVP	TA1535_pLCMSULT1A1	114 \pm 22
	TA1535_pLCMSULT1A1_cys	307 \pm 39
	TA1538_pLCMSULT1A1	222 \pm 21
	TA1538_pLCMSULT1A1_cys	90654 \pm 11517

Pelas curvas dose-resposta obtidas, e pelo cálculo das actividades mutagénicas (tabela III.4), constatou-se que a estirpe TA1538_SULT1A1_cys é aproximadamente 400 vezes mais sensível ($p < 0,0001$) a 12-OH-NVP, relativamente à sua estirpe isogénica, sem sobre-expressão de *cysDNC*. Da mesma forma, TA1535_SULT1A1_cys apresentou uma actividade mutagénica aproximadamente 3 vezes superior ($p < 0,0001$) à de TA1535_SULT1A1. Deste modo, constatou-se que, por um lado, estirpes sobre-expressando o operão *cysDNC* apresentam maior sensibilidade, e que 12-OH-NVP induz preferencialmente mutações *frameshift* no material genético das estirpes testadas.

IV Discussão

A biotransformação é o processo metabólico responsável pela modificação bioquímica de xenobióticos, sendo elaborado por sistemas enzimáticos especializados. Estas reacções normalmente convertem compostos químicos lipofílicos a produtos polares facilmente excretáveis, promovendo a destoxificação. Contudo, nalguns casos, químicos não tóxicos por si, podem ser bioactivados a intermediários reactivos por estas enzimas, gerando toxicidade (Parkinson, 2001). Deste modo, a biotransformação assume um papel crucial na toxicidade química.

NVP foi o primeiro INNTR aprovado pela FDA, utilizado no tratamento contra infecções por HIV-1 (FDA, 1996). Correntemente, esta droga é uma das mais prescritas, particularmente pelo seu efeito na prevenção da transmissão vertical do vírus, com uma profilaxia de dose única, ou em terapia combinada (Marseille *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2003; Lockman *et al.*, 2007). Contudo, apesar da sua eficácia clínica, a sua administração está associada a uma variedade de respostas tóxicas, sendo a mais severa, a hepatotoxicidade, e a mais comum, erupções cutâneas (Antunes *et al.*, 2010b). Por este motivo, desde 2000, este fármaco encontra-se listado na caixa preta de ameaça pela FDA, alertando o possível desenvolvimento de lesões hepáticas graves (FDA, 2000).

Numa variedade de ensaios, incluindo ensaios citogenéticos e testes de mutagenicidade *in vitro* standardizados, não foi possível demonstrar a mutagenicidade ou a clastogenicidade de NVP. Contudo, em roedores verificou-se o desenvolvimento de adenomas e carcinomas hepatocelulares após administração de NVP (Anonymous, 2009). Em humanos ainda não foi possível correlacionar o desenvolvimento de cancro com a toma de NVP, contudo, sugere-se uma possível associação entre o uso de INNTRs, incluindo NVP, e a ocorrência de cancro não comuns em pacientes infectados com HIV-1 (Powles *et al.*, 2009).

Pensa-se que a activação metabólica de NVP a electrófilos reactivos possa estar envolvida na sua toxicidade (Antunes *et al.*, 2008). Vários metabolitos hidroxilados de NVP, resultantes da acção de várias formas de CYPs, têm sido determinados (Pollard *et al.*, 1998; Marseille *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2003; Lockman *et al.*, 2007). No entanto, principalmente 12-hidroxi-NVP, parece estar envolvido na bioactivação deste antiretroviral, por formação do intermediário quinona-metideo de NVP, altamente reactivo. Foi sugerido que a sulfatação de 12-hidroxi-NVP esteja envolvida na formação deste intermediário reactivo (Chen *et al.*, 2008).

Para estudar o impacto químico de uma substância no material genético, os sistemas *in vitro* de uso mais frequente são bactérias e linhas celulares de mamíferos. Estes sistemas são úteis na elucidação dos mecanismos de mutagénese e verificação da genotoxicidade de vários compostos. Recorrendo a estes sistemas é possível detectar vários tipos de efeitos no material genético: mutações nos genes (mutações pontuais, *frameshift* ou por substituição de bases), clastogenicidade (alterações cromossómicas estruturais) e aneuploidia (aberrações cromossómicas numéricas) (Eastmond *et al.*, 2009).

Entre os sistemas celulares *in vitro*, os testes de mutagenicidade bacterianos são os mais comuns e os melhor validados, desenvolvidos em *S. typhimurium* e *E. coli*. Como vantagens, estes

sistemas são pouco complexos, de fácil manipulação genética, e permitem obter resultados de forma rápida e económica (Kranendonk *et al.*, 2000).

A maioria dos sistemas celulares utilizados em ensaios de mutagenicidade não é competente no metabolismo de xenobióticos (Kranendonk *et al.*, 2000). Por este motivo, tornou-se necessário incorporar sistemas metabólicos que representassem a biotransformação em mamíferos, de forma a aumentar a eficácia dos ensaios de mutagenicidade. As primeiras aproximações efectuadas incluíram a utilização de bactérias teste de mutagenicidade combinadas com fracção S9 (Langenbach *et al.*, 1992) nos testes de Ames. Contudo, com os avanços da biotecnologia, novas linhas celulares e novos sistemas celulares *in vitro* aplicados em testes de mutagenicidade, expressando enzimas da biotransformação, têm sido desenvolvidos. A expressão de enzimas da biotransformação humana dentro da própria célula alvo parece ser mais indicada para a determinação do potencial tóxico de xenobióticos, em relação a sistemas metabólicos exógenos, uma vez que elimina a barreira física entre o local de bioactivação e o alvo celular (Guengerich *et al.*, 1996; Kranendonk *et al.*, 2000).

IV.1 Desenvolvimento de uma estirpe competente em CYP e SULT humanos

O decorrente estudo encontra-se integrado no projecto “Papel do Citocromo P450 e da Sulfotransferase na Bioactivação do Fármaco Antiretroviral Nevirapina”, o qual tem por objectivo desenvolver bactérias teste de mutagenicidade inovadoras, competentes em CYP e SULT humanos, capazes de detectar a possível mutagenicidade induzida por NVP.

Numa fase inicial do estudo, foi construída a estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR, recorrendo à utilização da estirpe BTC-CYP de *E. coli* K12 desenvolvida por Duarte *et al.* (2005). Esta estirpe co-expressa CYP e CYPOR humanos, através de um sistema de expressão biplasmídico.

O facto de *E. coli* não possuir citocromos P450 torna esta bactéria um sistema apropriado para expressão heteróloga de CYPs humanos, o que possibilita o estudo da actividade destas enzimas sem a interferência de CYPs endógenos (Kranendonk *et al.*, 1997). Outro ponto de grande relevância é o facto deste sistema celular apresentar razões molares CYP:CYPOR semelhantes às fisiológicas humanas, permitindo uma actividade de CYP fidedigna (Moutinho *et al.*, 2012).

A nova estirpe bacteriana BTC2A6_SULT1A1_POR foi construída por transformação da estirpe PD301, com o sistema biplasmídico pCW_h2A6/pLCM_hSULT1A1_POR. Este novo sistema de co-expressão biplasmídica permitiu, por um lado, uma razão CYP:CYPOR semelhante à que se verifica em microssomas de fígado humano e, por outro, expressar SULT a níveis não exagerados, a partir de um vector de expressão *low-copy number* (pLCM). Elevados níveis de expressão de uma proteína heteróloga poderiam aumentar o *stress* bacteriano e resultar na activação de sistemas induzíveis por *stress*, como é o caso da resposta SOS, os quais poderiam interferir com a fidelidade dos resultados dos testes de mutagenicidade (Kranendonk *et al.*, 1998).

Após construção da estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR, confirmaram-se os seus conteúdos em CYP e SULT, e prosseguiu-se para a sua aplicação em testes de mutagenicidade, utilizando o composto padrão 1-MP. Este composto é um hidrocarboneto aromático policíclico que se demonstrou ser hidroxilado por CYP humano, incluindo CYP2A6, a 1-HMP (Engst *et al.*, 1999), o qual é eficientemente bioactivado por SULT1A1 humano (Meinl *et al.*, 2002).

A isoforma hCYP2A6 foi a seleccionada por ser descrito o seu envolvimento no metabolismo de NVP. Para além disso, hCYP2A6 apresenta grande afinidade pelo composto 1-MP (Glatt *et al.*, 1995) e participa extensivamente no metabolismo de vários fármacos (Torchin *et al.*, 1996) e na activação de muitas pró-drogas (Ikeda *et al.*, 2000). A isoforma hSULT1A1 foi escolhida por constituir uma das principais formas responsáveis pela sulfoconjugação de xenobióticos (Glatt *et al.*, 2001), cuja especificidade abrange uma larga gama de substratos com dimensões muito variáveis (Hempel *et al.*, 2005), e por ter sido descrita por Meinl *et al.* (2002) como uma forma muito específica para a sulfatação e bioactivação de 1-HMP, tornando-se mutagénico. Outra justificação para o desenvolvimento de estirpes competentes nas isoformas hCYP2A6 e hSULT1A1 foi o facto de serem particularmente expressas no fígado, órgão alvo dos efeitos secundários severos de NVP no homem, como também da formação de hepatocarcinomas em roedores (Torchin *et al.*, 1996; Glatt *et al.*, 2001).

Após sucessivos ensaios de mutagenicidade, não foi possível obter uma resposta mutagénica que demonstrasse a acção sequencial de hCYP2A6 e de hSULT1A1 na bioactivação de 1-MP. Assim, foi aplicada uma estratégia, com quatro abordagens, sobre a possível causa da insensibilidade da estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR: 1) condições de cultura e procedimento aplicado nos ensaios de mutagenicidade, 2) tipo de alvo genético da estirpe, 3) sensibilidade de *S. typhimurium* vs *E. coli*, e 4) disponibilidade celular de PAPS (tabela III.2). A hipótese de 1-HMP não ter sido formado a partir de 1-MP, por hCYP2A6, não foi considerada uma das razões da insensibilidade da estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR, por ter sido anteriormente demonstrado o alto nível de actividade de hCYP2A6 no sistema BTC-CYP2A6 (Duarte *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2007).

IV.2 Condições de cultura e procedimento aplicado nos ensaios de mutagenicidade

As condições de cultura bacterianas aplicadas no crescimento da estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR foram as descritas por Kranendonk *et al.* (1999b), optimizadas para uma actividade máxima de CYP na bioactivação de mutagénios químicos, e sua detecção. Assim, as culturas foram incubadas até atingirem a fase estacionária, tal como estandardizado na utilização de estirpes de Ames. O ensaio de mutagenicidade foi efectuado segundo a técnica de pré-incubação líquida descrita por Kranendonk *et al.* (1998), semelhante ao ensaio de mutagenicidade de pré-incubação líquida de Ames, contudo adaptado para estirpes de *E. coli* com expressão heteróloga de CYPs humanos.

Uma vez que, as estirpes BTC-CYP do nosso laboratório se encontram bem caracterizadas quanto à actividade de CYP nestas condições, a primeira suposição foi que as condições de cultura e o procedimento aplicado não fossem ideais para a actividade de SULT.

Trabalhos publicados por Glatt e colaboradores, utilizando estirpes de *S. typhimurium* competentes em SULTs, descrevem um ensaio de mutagenicidade de pré-incubação líquida modificado de Ames (Glatt *et al.*, 1998). Neste procedimento, utilizam-se culturas na fase exponencial inicial, posteriormente ajustadas a densidade de cultura correspondente a $1 - 2 \times 10^9$ UCF/mL. Outra das diferenças em relação ao ensaio de Ames é o facto da pré-incubação ser feita em presença de sulfato de magnésio.

Pelo presente estudo inferiu-se que, a fase de crescimento bacteriano é um factor crucial para a actividade de SULT expressa, o que justifica a aplicação da cultura no início da fase de crescimento exponencial. O sulfato de magnésio, utilizado na pré-incubação, funciona como fonte exógena suplementar de sulfato, possivelmente limitante nos ensaios de Ames.

Com a finalidade de reproduzir os resultados de Meinl *et al.* (2002), a estirpe TA1538_pKKSULT1A1, foi construída e ensaiada de acordo com o procedimento descrito, utilizando o composto teste 1-HMP (figura III.9). A actividade mutagénica obtida (10474 ± 29 revertentes/nmol 1-HMP) foi próxima da descrita no referido estudo (14000 revertentes/nmol 1-HMP), o que indicou a importância do procedimento aplicado por Glatt e colaboradores na actividade de SULT, e bioactivação de 1-HMP.

IV.3 Evento de reversão do alvo genético da estirpe e sensibilidade de *S. typhimurium* vs *E. coli*

Em estirpes teste de mutagenicidade de *S. typhimurium* de Ames, existem vários tipos de mutação no alvo genético que detectam eventos de reversão específicos. As estirpes TA1538 e TA98 contêm uma mutação *frameshift* no seu DNA alvo, *hisD3052*, sendo esta revertida à forma *wild-type* principalmente por mutagénios capazes de modificar a grelha de leitura do alvo genético (Isono e Yournon, 1974). Nas estirpes TA1535 e TA100, o locus *hisG46* apresenta a substituição de uma leucina (GAG/CTC) por uma prolina (GGG/CCC). Esta mutação é revertida à forma *wild-type* por mutagénios que causam preferencialmente substituição de pares de bases num dos pares GC (Barnes *et al.*, 1982).

Tal como as estirpes TA1535 e TA100, a estirpe teste BTC de *E. coli* apresenta uma mutação por substituição de pares de bases no seu alvo genético *argE3*. Contudo, a reversão à prototrofia por arginina pode ocorrer por todas as transições e transversões possíveis (Kranendonk *et al.*, 1994).

Para determinar o tipo de reversão que o mutagénio padrão 1-HMP preferencialmente induz, repetiu-se o ensaio descrito por Meinl *et al.* (2002) com as estirpes TA1535_pKKSULT1A1 (figura III.9) e BTC_SULT1A1 (figura III.10). A primeira estirpe não respondeu a 1-HMP, no entanto, na estirpe BTC_SULT1A1 obteve-se uma actividade mutagénica de 37 ± 6 revertentes/nmol 1-HMP. Ainda assim, esta resposta foi aproximadamente 300 vezes inferior ($p < 0,0001$) à obtida na estirpe TA1538_pKKSULT1A1 (10474 ± 29 revertentes/nmol 1-HMP). Este resultado demonstrou que 1-HMP causa preferencialmente mutações *frameshift*.

A resposta mutagénica da estirpe BTC_SULT1A1 ao composto 1-HMP face à ausência de resposta da estirpe TA1535_pKKSULT1A1 pode ser explicada, 1) pela reversão à prototrofia por arginina ocorrer por todas as possíveis substituições de bases, por transições e transversões (Kranendonk *et al.*, 1994), e não só por substituições nas bases CG, e 2) pela presença do operão *mucAB* no plasmídeo pLCM_hSULT1A1, o qual aumenta a sensibilidade de detecção de mutagenicidade.

Perante os resultados e, sabendo que 1-HMP é o metabolito obtido *in vivo* pela hidroxilação de 1-MP por hCYP2A6, postula-se que o mutagénio padrão 1-MP deveria ser detectável na estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR. Assim, propôs-se que a causa da insensibilidade de

BTC2A6_SULT1A1_POR não se deva, pelo menos exclusivamente, ao tipo do alvo genético de BTC2A6_SULT1A1_POR.

IV.4 Aproximação das estirpes TA1538 e TA1535 de *S. typhimurium* ao sistema BTC

Para aproximar a estirpe TA1538 de *S. typhimurium* à estirpe BTC de *E. coli*, no que se refere à presença do operão *mucAB*, construiu-se a estirpe TA1538_pLCMSULT1A1. Por comparação da performance da estirpe TA1538 expressando hSULT1A1, desenvolvida por Meinel *et al.* (2002), com a estirpe TA1538_pLCMSULT1A1 (figura III.11), confirmou-se que o sistema biplasmídico pCWΔ/pLCM_hSULT1A1 confere maior sensibilidade na detecção de mutagenicidade induzida por 1-HMP, do que o plasmídeo pKK233-2_SULT.

A actividade mutagénica de TA1538_pLCMSULT1A1 (28173 ± 1938 revertentes/nmol 1-HMP), foi aproximadamente 3 vezes superior ($p < 0,0001$) à da estirpe TA1538_pKKSULT1A1 (10474 ± 29 revertentes/nmol 1-HMP). Pelos resultados obtidos, concluiu-se que, apesar do plasmídeo pKK233-2 ter vindo a mostrar utilidade na expressão constitutiva de SULT, em estirpes de *S. typhimurium* (Glatt *et al.*, 1995; Hagen *et al.*, 1998), a ausência do operão *mucAB* torna as bactérias menos eficientes na detecção de mutagenicidade do que estirpes contendo este operão no DNA plasmídico. Outra das vantagens do sistema biplasmídico pCWΔ/pLCM_hSULT1A1 é possibilitar uma expressão controlada de hSULT1A1, devido à presença de *lacI^f* no plasmídeo pCWΔ, importante para a manutenção da estirpe recombinante.

No sentido de desenvolver uma estirpe de *S. typhimurium* próxima da estirpe BTC, no que respeita, não só ao conteúdo plasmídico, mas também ao evento de reversão por substituição de bases, construiu-se a estirpe TA1535_pLCMSULT1A1. Esta estirpe foi testada com o composto padrão FFA (figura III.12) pois, estudos prévios utilizando a estirpe TA100, expressando SULTs humanas e de rato, demonstraram a sua mutagenicidade, sugerindo que FFA seja convertido por sulfoconjugação, a 2-sulfometilfurano, electrófilo reactivo capaz de induzir mutagenicidade por substituição de bases (Glatt *et al.*, 2012). A actividade mutagénica obtida com o composto padrão FFA (21033 ± 1168 revertentes/ μ mol FFA) foi aproximadamente 12 vezes superior à descrita por Glatt *et al.* (2012) (1800 revertentes/ μ mol FFA). Uma possível explicação para esta sensibilidade aumentada pode ser a incompatibilidade entre os plasmídeos pKK233-2 e pKM101, contidos na estirpe TA100 (ambos de classe pMB1), construída por Glatt *et al.* (2012). A perda de um, ou dos dois plasmídeos, afectaria a sensibilidade da estirpe, por ausência do operão *mucAB* contido no plasmídeo pKM101, e/ou a capacidade de bioactivação do mutagénio padrão FFA por hSULT1A1, devido à perda do plasmídeo pKK233-2_SULT1A1. Na estirpe TA1535_pLCMSULT1A1, a estabilidade plasmídica é mantida pois, pCW e pLCM possuem diferentes origens de replicação, pertencentes às classes pMB1 e p15A, respectivamente (Kranendonk *et al.*, 2000).

IV.5 Disponibilidade celular de PAPS

Para que sulfato possa ser utilizado em reacções de sulfonação, tem necessariamente de ser activado a PAPS, pelas enzimas ATP sulfúrilase e APS cinase (Siegel, 1975). Estas enzimas encontram-se codificadas em genes incluídos no braço redutivo da via de biossíntese de cisteína em

S. typhimurium e *E. coli* (Kreditch, 1987), designadamente no operão *cysDNC* (figura IV.1). ATP sulfurilase é composta por duas diferentes subunidades codificadas por *cysD* (subunidade catalítica) e *cysN* (subunidade regulatória), enquanto APS cinase é codificada por *cysC*, sendo estes genes transcritos na ordem *cysD*, *cysN* e *cysC* (Leyh *et al.*, 1988).

Sugere-se que ATP sulfurilase e APS cinase estejam intimamente associadas num complexo multifuncional, que permita uma transferência directa de APS do sítio activo de ATP sulfurilase para APS cinase, formando PAPS (Renosto *et al.*, 1987).

Em condições aeróbias, a transcrição da maioria dos genes *cys* é positivamente regulada pelo produto de *cysB*, e seu co-indutor O-acetilserina; e, negativamente regulada por sulfido (figura IV.1). No entanto, estudos descritos por Neuwald *et al.* (1992) sugerem que o gene *cysQ*, também seja necessário para a síntese de cisteína em *E. coli* K12, em condições de aerobiose. Postula-se que o produto do gene *cysQ*, tenha um papel regulatório estreito sobre PAPS, assegurando a sua disponibilidade a níveis que, por um lado, não sejam tóxicos (Neuwald *et al.*, 1992), e por outro, minimizem os gastos de energia para a célula, sob a forma de ATP e GTP (Liu *et al.*, 1998).

No presente estudo, constatou-se uma menor sensibilidade das estirpes teste em condições de maior oxigenação. Partindo do pressuposto acima, propõe-se que nestas condições, PAPS se encontre em condições estreitamente reguladas pelo produto do gene *cysQ*, impedindo a sua disponibilidade na reacção de sulfatação, diminuindo a sensibilidade de estirpes competentes em SULT.

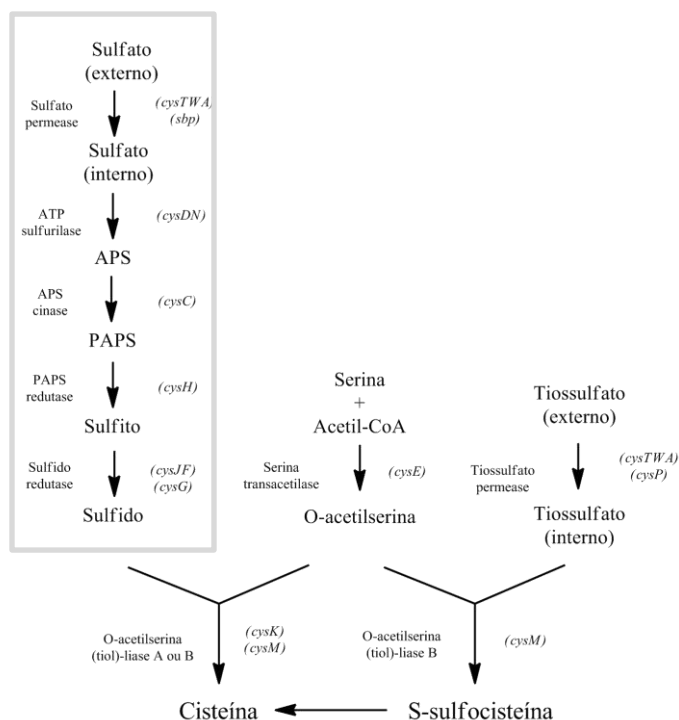


Figura IV.1 – Via biossintética de cisteína em *S. typhimurium* e *E. coli*. O braço redutivo da via encontra-se destacado no interior do rectângulo cinza. O sulfato é transportado para o interior da célula e reduzido a sulfido, o qual reage com O-acetilserina, produto do segundo braço da via biossintética, para formar cisteína. O tiosulfato é transportado para o interior da célula e reage com O-acetilserina para formar S-sulfocisteína, que é depois reduzida a cisteína (adaptado de Kreditch, 1987).

Considerando a limitação de PAPS como explicação para a não detecção de mutagenicidade de 1-MP na estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR e, com o objectivo de aumentar os níveis de PAPS intracelular, foram desenvolvidas novas estirpes de *S. typhimurium* competentes em hSULT1A1, com sobre-expressão de *cysDNC*. Com as estirpes desenvolvidas realizaram-se testes de mutagenicidade, utilizando culturas em várias fases de crescimento e fez-se, simultaneamente, doseamento semi-quantitativo da expressão de hSULT1A1. Os resultados obtidos mostraram que, estirpes com sobre-expressão de *cysDNC* tornam-se mais sensíveis na detecção de mutagenicidade, apresentando níveis de expressão de hSULT1A1 comparáveis ao longo do crescimento bacteriano. O mesmo não se verificou nas estirpes sem sobre-expressão deste operão, nas quais se constatou o decaimento da resposta mutagénica a partir de uma densidade de cultura DO_{600} 0,9.

Através deste estudo obtiveram-se várias indicações: 1) hSULT1A1 parece ser expressa ao longo do crescimento bacteriano a níveis consideráveis, 2) sem sobre-expressão do operão *cysDNC* há uma marcada quebra das respostas mutagénicas das estirpes, a densidades de cultura superiores a DO_{600} 0,9, o que explica a densidade de cultura utilizada no ensaio de pré-incubação aplicado (Meinl *et al.*, 2002), e 3) a sobre-expressão do operão *cysDNC* provoca um aumento da resposta mutagénica das estirpes a densidades de cultura superiores a DO_{600} 0,9. Os referidos dados são fortes indicadores de que PAPS seja o factor limitante da actividade de SULT em estirpes sem sobre-expressão de *cysDNC*.

As actividades mutagénicas obtidas para os mutagénios padrão, 1-HMP e FFA, mostraram um forte aumento da sensibilidade das estirpes competentes em hSULT1A1, sobre-expressando o operão *cysDNC*. No caso das estirpes derivadas de TA1538, a actividade mutagénica de 1-HMP obtida com a estirpe TA1538_pLCMSULT1A1 foi 28173 ± 1938 revertentes/nmol, e com a estirpe TA1538_pLCMSULT1A1_cys aumentou para aproximadamente o dobro ($p < 0,05$), 45726 ± 12300 revertentes/nmol. No caso das estirpes derivadas de TA1535, a actividade mutagénica de FFA obtida com TA1535_pLCMSULT1A1_cys (151937 ± 27169 revertentes/ μ mol FFA) foi aproximadamente 7 vezes superior ($p < 0,0001$) à da sua precursora TA1535_pLCMSULT1A1 (21033 ± 1168 revertentes/ μ mol FFA).

IV.6 Estudo da bioactivação de 12-hidroxi-NVP

Para estudar a hipótese de NVP ser bioactivado a electrófilos reactivos com o envolvimento de hSULT1A1, procedeu-se à realização de ensaios de mutagenicidade utilizando o composto teste 12-hidroxi-NVP. Este composto é um dos metabolitos de NVP, o qual é indicado por vários estudos como estando envolvido na bioactivação de NVP. Para testar esta hipótese, a 12-hidroxi-NVP foi testado nas estirpes TA1538_pLCMSULT1A1, TA1538_pLCMSULT1A1_cys, TA1535_pLCMSULT1A1 e TA1535_pLCMSULT1A1_cys. Todas as estirpes apresentaram resposta mutagénica, no entanto, a estirpe com maior sensibilidade foi a estirpe TA1538_pLCMSULT1A1_cys, aproximadamente 400 vezes mais sensível ($p < 0,0001$) do que a sua isogénica sem sobre-expressão do operão *cysDNC*. Relativamente à estirpe TA1535_pLCMSULT1A1_cys, foi obtida uma actividade mutagénica de 307 ± 39 revertentes/ μ mol 12-hidroxi-NVP, apresentando maior sensibilidade ($p < 0,0001$) em relação à estirpe TA1535_pLCMSULT1A1 (114 ± 22 revertentes/ μ mol 12-hidroxi-

NVP). Os resultados obtidos demonstram que a sulfatação de 12-hidroxi-NVP leva à bioativação do fármaco NVP, induzindo mutagenicidade preferencialmente por mutações *frameshift* nas estirpes *S. typhimurium* de Ames.

Os resultados obtidos no presente estudo sobre o papel de hSULT1A1 na bioativação de NVP através da sulfatação de 12-hidroxi-NVP estão em concordância com estudos previamente publicados. Estudos conduzidos por Antunes *et al.* (2008), permitiram detectar e caracterizar múltiplos adutos no DNA por NMR e MS, utilizando 12-mesiloxi-NVP como modelo mimético de 12-sulfoxi-NVP. Para além disso, o mesmo grupo demonstrou a formação de adutos *in vitro* entre 12-mesiloxi-NVP e proteínas do sangue, HSA e Hb (Antunes *et al.*, 2010b). Adutos derivados de 12-hidroxi-NVP com Hb foram também identificados em doentes infectados por HIV-1, com terapêutica múltipla, incluindo NVP (Caixas *et al.*, 2012). Os adutos detectados podem constituir biomarcadores na iniciação de eventos mutagénicos, responsáveis pela hepatocarcinogenicidade da NVP (Antunes *et al.*, 2008; Antunes *et al.*, 2010a; Caixas *et al.*, 2012). Apesar de testes toxicológicos genéticos, incluindo ensaios de mutagenicidade em células de mamíferos e bacterianas, não terem evidenciado a mutagenicidade nem a clastogenicidade de NVP até ao momento, estudos *in vivo* com roedores aos quais foi administrado NVP, mostraram um aumento de incidência de adenomas e carcinomas hepatocelulares (Anonymous, 2009). Outra evidência da bioativação de NVP e do papel de SULT neste processo, foi dada por Chen *et al.* (2008) pela detecção de 12-sulfoxi-NVP por LC-MS em amostras de urina e de biliar em ratinhos aos quais foi administrado NVP. No mesmo estudo foi ainda possível verificar o papel de 12-hidroxi-NVP no desenvolvimento de erupções cutâneas idiossincráticas que lembram as que ocorrem em humanos, nos ratinhos modelo (Shenton *et al.*, 2003; Shenton *et al.*, 2005).

IV.7 Conclusão e perspectivas futuras

Em conclusão, neste estudo foram desenvolvidos novos sistemas teste de mutagenicidade competentes em hSULT1A1 com sensibilidade aumentada na detecção de pré-mutagénios dependentes de hSULT1A1, através da introdução de novos sistemas bioplasmídicos em estirpes teste de mutagenicidade de *E. coli* e de *S. typhimurium*. No entanto, a sensibilidade das novas estirpes mostrou-se fortemente dependente da fase de crescimento, em estirpes de *S. typhimurium* pois, bactérias obtidas com densidades de cultura superiores a DO₆₀₀ 0,9 reduziram a capacidade de demonstrar a mutagenicidade de pré-mutagénios dependentes de hSULT1A1. Para superar esta limitação, um passo inovador deste trabalho, e importante do ponto de vista procedimental, foi o desenvolvimento de estirpes competentes em hSULT1A1, sobre-expressando o operão *cysDNC*. No presente estudo, sugere-se que nestas estirpes, PAPS seja mantido desde densidades de cultura DO₆₀₀ 0,1 a 1,2. Para além disso, estas estirpes mostraram uma sensibilidade aumentada em relação às inicialmente desenvolvidas. Com as novas estirpes foi possível detectar a mutagenicidade de 12-hidroxi-NVP, dependente de SULT1A1, confirmando o papel de 12-hidroxi-NVP, e sua sulfatação, na bioativação de NVP, implicada em efeito secundários severos.

No seu conjunto, os resultados obtidos contribuíram para esclarecer aspectos relacionados com a biotransformação de xenobióticos mediada por SULT, recorrendo ao desenvolvimento de

sistemas teste de mutagenicidade com expressão heteróloga de SULT1A1 humana. Numa primeira fase, perspectiva-se a continuidade deste trabalho através de uma melhor caracterização e validação das novas estirpes de *S. typhimurium* competentes em hSULT1A1. Neste ponto do trabalho, deseja-se transpor e ajustar toda a metodologia para estirpes BTC de *E. coli*, competentes em hSULT1A1, com e sem sobre-expressão de *cysDNC*, caracterizar estas estirpes com recurso a compostos padrão bioactivados por hSULT1A1 e, por fim, testar 12-hidroxi-NVP. Para estudar a importância dos níveis intracelulares de PAPS nas estirpes competentes em hSULT1A1, estipula-se ainda, quantificar os níveis de expressão do operão *cysDNC*, em diferentes fases de crescimento das estirpes bacterianas desenvolvidas, com recorrência à técnica de RT-qPCR.

Uma linha de estudo importante na continuação deste trabalho, será a optimização das condições de cultura da estirpe BTC2A6_SULT1A1_POR de *E. coli* previamente desenvolvida, e sua adaptação para sobre-expressão de *cysDNC*, através do sistema desenvolvido neste estudo. Para tal, deverão ser ajustados vários parâmetros, de modo a que CYP e SULT sejam expressos simultaneamente, e que PAPS se encontre disponível em níveis capazes de suportar a actividade de SULT. Deste modo, parâmetros como temperatura, condições de arejamento e fases de crescimento da cultura deverão ser rigorosamente optimizados. A expressão de diferentes formas de CYPs e de SULTs na estirpe BTC de *E. coli* seria também uma mais valia para o estudo da bioactivação de NVP, e do impacte que as diferentes formas enzimáticas exercem sobre a mutagenicidade deste fármaco.

A expressão de enzimas humanas de fase I e de fase II, em sistemas teste de mutagenicidade, constitui um estudo pioneiro e um grande desafio. No entanto, poderá representar um importante contributo no estudo das vias de bioactivação e na mutagénese química induzida por NVP e outros fármacos.

A confirmação do papel de NVP na indução de mutagenicidade e carcinogenicidade, será um ponto de partida para um posterior desenho racional de análogos mais seguros deste fármaco. Sendo a NVP um dos antiretrovirais mais prescritos na prevenção da transmissão vertical do vírus HIV-1, a introdução de medicamentos de substituição mais seguros é determinante na saúde do recém-nascido, evitando o risco de sobredosagem, efeitos colaterais e problemas de saúde a longo prazo para a criança.

V Bibliografia

- Ames, B. N., Lee, F. D. e Durston, W. E. 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 782-786.
- Ames, B. N., McCann, J. e Yamasaki, E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test. *Mutation research* 31: 347-364.
- Anonymous. 2009. *Physicians' Desk Reference*. Physicians' Desk Reference, Montvale, NJ.
- Antunes, A. M., Duarte, M. P., Santos, P. P., da Costa, G. G., Heinze, T. M., Beland, F. A. e Marques, M. M. 2008. Synthesis and characterization of DNA adducts from the HIV reverse transcriptase inhibitor nevirapine. *Chemical research in toxicology* 21: 1443-1456.
- Antunes, A. M., Godinho, A. L., Martins, I. L., Justino, G. C., Beland, F. A. e Marques, M. M. 2010a. Amino acid adduct formation by the nevirapine metabolite, 12-hydroxynevirapine--a possible factor in nevirapine toxicity. *Chemical research in toxicology* 23: 888-899.
- Antunes, A. M., Godinho, A. L., Martins, I. L., Justino, G. C., Beland, F. A. e Marques, M. M. 2010b. Amino acid adduct formation by the nevirapine metabolite, 12-hydroxynevirapine-a possible factor in nevirapine toxicity. *Chemical research in toxicology* 23: 888-899.
- Barnes, W., Tuley, E. e Eisenstadt, E. 1982. Base-sequence analysis of His⁺ revertants of the *hisG46* missense mutation in *Salmonella typhimurium*. *Environmental mutagenesis* 4: 297.
- Bullas, L. R. e Ryu, J. I. 1983. *Salmonella typhimurium* LT2 strains which are r⁻ m⁺ for all three chromosomally located systems of DNA restriction and modification. *Journal of bacteriology* 156: 471-474.
- Caixas, U., Antunes, A. M., Marinho, A. T., Godinho, A. L., Grilo, N. M., Marques, M. M., Oliveira, M. C., Branco, T., Monteiro, E. C. e Pereira, S. A. 2012. Evidence for nevirapine bioactivation in man: Searching for the first step in the mechanism of nevirapine toxicity. *Toxicology* 301: 33-39.
- Chen, J., Mannargudi, B. M., Xu, L. e Uetrecht, J. 2008. Demonstration of the metabolic pathway responsible for nevirapine-induced skin rash. *Chemical research in toxicology* 21: 1862-1870.
- Chiba, H., Komatsu, K., Lee, Y. C., T., T. e Strott, C. A. 1995. The 3'-terminal exon of the family of steroid and phenol sulfotransferase genes is spliced at the N-terminal glycine of the universally conserved GXXGXXK motif that forms the sulfonate donor binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8176-8179.
- Davila, J. C., Rodriguez, R. J., Melchert, R. B. e Acosta, D., Jr. 1998. Predictive value of in vitro model systems in toxicology. *Annual review of pharmacology and toxicology* 38: 63-96.
- De Clercq, E. 1992. HIV inhibitors targeted at the reverse transcriptase. *AIDS research and human retroviruses* 8: 119-134.
- Duarte, M. P., Palma, B. B., Gilep, A. A., Laires, A., Oliveira, J. S., Usanov, S. A., Rueff, J. e Kranendonk, M. 2007. The stimulatory role of human cytochrome b5 in the bioactivation activities of human CYP1A2, 2A6 and 2E1: a new cell expression system to study cytochrome

- P450-mediated biotransformation (a corrigendum report on Duarte et al. (2005) *Mutagenesis* 20, 93-100). *Mutagenesis* 22: 75-81.
- Duarte, M. P., Palma, B. B., Laires, A., Oliveira, J. S., Rueff, J. e Kranendonk, M. 2005. *Escherichia coli* BTC, a human cytochrome P450 competent tester strain with a high sensitivity towards alkylating agents: involvement of alkyltransferases in the repair of DNA damage induced by aromatic amines. *Mutagenesis* 20: 199-208.
- Eastmond, D. A., Hartwig, A., Anderson, D., Anwar, W. A., Cimino, M. C., Dobrev, I., Douglas, G. R., Nohmi, T., Phillips, D. H. e Vickers, C. 2009. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis* 24: 341-349.
- EC. 2012. Laboratory Animals. Version 14 Setembro 2012. http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm in European Commission - Environment, <http://ec.europa.eu/>.
- Engst, W., Landsiedel, R., Hermersdorfer, H., Doehmer, J. e Glatt, H. 1999. Benzylic hydroxylation of 1-methylpyrene and 1-ethylpyrene by human and rat cytochromes P450 individually expressed in V79 Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 20: 1777-1785.
- FDA. 1996. FDA Approves Nevirapine to Treat HIV. Version June 24 1996. <http://aidsinfo.nih.gov/news/290/fda-approves-nevirapine-to-treat-hiv> in HIV/AIDS News, <http://aidsinfo.nih.gov/>.
- FDA. 2000. The FDA safety information and adverse event reporting program. Versio November 2000. <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/default.htm> in Safety information, <http://www.fda.gov/default.htm>.
- Friedberg, T., Pritchard, M. P., Bandera, M., Hanlon, S. P., Yao, D., McLaughlin, L. A., Ding, S., Burchell, B. e Wolf, C. R. 1999. Merits and limitations of recombinant models for the study of human P450-mediated drug metabolism and toxicity: an intralaboratory comparison. *Drug metabolism reviews* 31: 523-544.
- Glatt, H. 1997. Sulfation and sulfotransferases 4: bioactivation of mutagens via sulfation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11: 314-321.
- Glatt, H. 2000a. Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chemico-biological interactions* 129: 141-170.
- Glatt, H., Bartsch, I., Christoph, S., Coughtrie, M. W., Falany, C. N., Hagen, M., Landsiedel, R., Pabel, U., Phillips, D. H., Seidel, A. e Yamazoe, Y. 1998. Sulfotransferase-mediated activation of mutagens studied using heterologous expression systems. *Chemico-biological interactions* 109: 195-219.
- Glatt, H., Bartsch, I., Czich, A., Seidel, A. e Falany, C. N. 1995. *Salmonella* strains and mammalian cells genetically engineered for expression of sulfotransferases. *Toxicology letters* 82-83: 829-834.
- Glatt, H., Boeing, H., Engelke, C. E., Ma, L., Kuhlow, A., Pabel, U., Pomplun, D., Teubner, W. e Meinel, W. 2001. Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects. *Mutation research* 482: 27-40.

- Glatt, H., Engelke, C. E., Pabel, U., Teubner, W., Jones, A. L., Coughtrie, M. W., Andrae, U., Falany, C. N. e Meinl, W. 2000. Sulfotransferases: genetics and role in toxicology. *Toxicology letters* 112-113: 341-348.
- Glatt, H. e Meinl, W. 2004. Pharmacogenetics of soluble sulfotransferases (SULTs). *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 369: 55-68.
- Glatt, H., Schneider, H., Murkovic, M., Monien, B. H. e Meinl, W. 2012. Hydroxymethyl-substituted furans: mutagenicity in *Salmonella typhimurium* strains engineered for expression of various human and rodent sulphotransferases. *Mutagenesis* 27: 41-48.
- Glatt, H. R. 2000b. An overview of bioactivation of chemical carcinogens. *Biochemical Society transactions* 28: 1-6.
- Guengerich, F. P. 1992. Metabolic activation of carcinogens. *Pharmacology & therapeutics* 54: 17-61.
- Guengerich, F. P. e Cheng, Q. 2011. Orphans in the human cytochrome P450 superfamily: approaches to discovering functions and relevance in pharmacology. *Pharmacological reviews* 63: 684-699.
- Guengerich, F. P., Gillam, E. M. e Shimada, T. 1996. New applications of bacterial systems to problems in toxicology. *Critical reviews in toxicology* 26: 551-583.
- Guengerich, F. P. e MacDonald, J. S. 2007. Applying mechanisms of chemical toxicity to predict drug safety. *Chemical research in toxicology* 20: 344-369.
- Hagen, M., Pabel, U., Landsiedel, R., Bartsch, I., Falany, C. N. e Glatt, H. 1998. Expression of human estrogen sulfotransferase in *Salmonella typhimurium*: differences between hHST and hEST in the enantioselective activation of 1-hydroxyethylpyrene to a mutagen. *Chemico-biological interactions* 109: 249-253.
- Hakura, A., Suzuki, S. e Satoh, T. 1999. Advantage of the use of human liver S9 in the Ames test. *Mutation research* 438: 29-36.
- Hartman, T. L. e Buckheit, R. W., Jr. 2012. The Continuing Evolution of HIV-1 Therapy: Identification and Development of Novel Antiretroviral Agents Targeting Viral and Cellular Targets. *Molecular biology international* 2012: 401965.
- Hempel, N., Negishi, M. e McManus, M. E. 2005. Human SULT1A genes: cloning and activity assays of the SULT1A promoters. *Methods in enzymology* 400: 147-165.
- Hlavica, P., Schulze, J. e Lewis, D. F. 2003. Functional interaction of cytochrome P450 with its redox partners: a critical assessment and update of the topology of predicted contact regions. *Journal of inorganic biochemistry* 96: 279-297.
- Ikedo, K., Yoshisue, K., Matsushima, E., Nagayama, S., Kobayashi, K., Tyson, C. A., Chiba, K. e Kawaguchi, Y. 2000. Bioactivation of tegafur to 5-fluorouracil is catalyzed by cytochrome P-450 2A6 in human liver microsomes in vitro. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6: 4409-4415.
- Ingelman-Sundberg, M. 2004a. Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 369: 89-104.
- Ingelman-Sundberg, M. 2004b. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends in pharmacological sciences* 25: 193-200.

- Isin, E. M. e Guengerich, F. P. 2007. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et biophysica acta* 1770: 314-329.
- Isin, E. M. e Guengerich, F. P. 2008. Substrate binding to cytochromes P450. *Analytical and bioanalytical chemistry* 392: 1019-1030.
- Isono, K. e Yourno, J. 1974. Chemical carcinogens as frameshift mutagens: Salmonella DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71: 1612-1617.
- Iyanagi, T., Makino, N. e Mason, H. S. 1974. Redox properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b5 reductases. *Biochemistry* 13: 1701-1710.
- Iyanagi, T., Makino, R. e Anan, F. K. 1981. Studies on the microsomal mixed-function oxidase system: mechanism of action of hepatic NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Biochemistry* 20: 1722-1730.
- Jackson, J. B., Musoke, P., Fleming, T., Guay, L. A., Bagenda, D., Allen, M., Nakabiito, C., Sherman, J., Bakaki, P., Owor, M., Ducar, C., Deseyve, M., Mwatha, A., Emel, L., Duefield, C., Mirochnick, M., Fowler, M. G., Mofenson, L., Miotti, P., Gigliotti, M., Bray, D. e Mmiro, F. 2003. Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: 18-month follow-up of the HIVNET 012 randomised trial. *Lancet* 362: 859-868.
- Janion, C. 2008. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *International journal of biological sciences* 4: 338-344.
- Komatsu, K., Driscoll, W. J., Koh, Y. C. e Strott, C. A. 1994. A P-loop related motif (GxxGxxK) highly conserved in sulfotransferases is required for binding the activated sulfate donor. *Biochemical and biophysical research communications* 204: 1178-1185.
- Kranendonk, M., Carreira, F., Theisen, P., Laires, A., Fisher, C. W., Rueff, J., Estabrook, R. W. e Vermeulen, N. P. 1999a. *Escherichia coli* MTC, a human NADPH P450 reductase competent mutagenicity tester strain for the expression of human cytochrome P450 isoforms 1A1, 1A2, 2A6, 3A4, or 3A5: catalytic activities and mutagenicity studies. *Mutation research* 441: 73-83.
- Kranendonk, M., Commandeur, J. N., Laires, A., Rueff, J. e Vermeulen, N. P. 1997. Characterization of enzyme activities and cofactors involved in bioactivation and bioinactivation of chemical carcinogens in the tester strains *Escherichia coli* K12 MX100 and *Salmonella typhimurium* LT2 TA100. *Mutagenesis* 12: 245-254.
- Kranendonk, M., Fisher, C. W., Roda, R., Carreira, F., Theisen, P., Laires, A., Rueff, J., Vermeulen, N. P. e Estabrook, R. W. 1999b. *Escherichia coli* MTC, a NADPH cytochrome P450 reductase competent mutagenicity tester strain for the expression of human cytochrome P450: comparison of three types of expression systems. *Mutation research* 439: 287-300.
- Kranendonk, M., Laires, A., Rueff, J., Estabrook, W. R. e Vermeulen, N. P. 2000. Heterologous expression of xenobiotic mammalian-metabolizing enzymes in mutagenicity tester bacteria: an update and practical considerations. *Critical reviews in toxicology* 30: 287-306.

- Kranendonk, M., Mesquita, P., Laires, A., Vermeulen, N. P. e Rueff, J. 1998. Expression of human cytochrome P450 1A2 in *Escherichia coli*: a system for biotransformation and genotoxicity studies of chemical carcinogens. *Mutagenesis* 13: 263-269.
- Kranendonk, M., Ruas, M., Laires, A. e Rueff, J. 1994. Isolation and prevalidation of an *Escherichia coli* tester strain for the use in mechanistic and metabolic studies of genotoxins. *Mutation research* 312: 99-109.
- Kreditch, N. M. 1987. *Escherichia Coli* and *Salmonella Typhimurium*. In *Cellular and Molecular Biology* (F. C. Neihardt, eds), pp 419-428, American Society of Microbiology, Washington, D. C.
- Langenbach, R., Smith, P. B. e Crespi, C. 1992. Recombinant DNA approaches for the development of metabolic systems used in in vitro toxicology. *Mutation research* 277: 251-275.
- Leyh, T. S., Taylor, J. C. e Markham, G. D. 1988. The sulfate activation locus of *Escherichia coli* K12: cloning, genetic, and enzymatic characterization. *The Journal of biological chemistry* 263: 2409-2416.
- Liu, C., Wang, R., Varlamova, O. e Leyh, T. S. 1998. Regulating energy transfer in the ATP sulfurylase-GTPase system. *Biochemistry* 37: 3886-3892.
- Lockman, S., Shapiro, R. L., Smeaton, L. M., Wester, C., Thior, I., Stevens, L., Chand, F., Makhema, J., Moffat, C., Asmelash, A., Ndase, P., Arimi, P., van Widenfelt, E., Mazhani, L., Novitsky, V., Lagakos, S. e Essex, M. 2007. Response to antiretroviral therapy after a single, peripartum dose of nevirapine. *The New England journal of medicine* 356: 135-147.
- Maron, D. M. e Ames, B. N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity testing. *Mutation Research* 113: 173-215.
- Marseille, E., Kahn, J. G., Mmiro, F., Guay, L., Musoke, P., Fowler, M. G. e Jackson, J. B. 1999. Cost effectiveness of single-dose nevirapine regimen for mothers and babies to decrease vertical HIV-1 transmission in sub-Saharan Africa. *Lancet* 354: 803-809.
- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. e Ames, B. N. 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72: 5135-5139.
- Meinl, W., Meerman, J. H. e Glatt, H. 2002. Differential activation of promutagens by alloenzymes of human sulfotransferase 1A2 expressed in *Salmonella typhimurium*. *Pharmacogenetics* 12: 677-689.
- Miller, E. C. e Miller, J. A. 1981. Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer* 47: 1055-1064.
- Miller, J. A. 1994. Sulfonation in chemical carcinogenesis--history and present status. *Chemico-biological interactions* 92: 329-341.
- Molla, A., Granneman, G. R., Sun, E. e Kempf, D. J. 1998. Recent developments in HIV protease inhibitor therapy. *Antiviral research* 39: 1-23.
- Montellano, O. d. 1995. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry* (P. R. Ortiz de Montellano, eds), 3ª ed., pp 245-304, Plenum Press, New York.
- Mortelmans, K. e Zeiger, E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation research* 455: 29-60.

- Moutinho, D., Marohnic, C. C., Panda, S. P., Rueff, J., Masters, B. S. e Kranendonk, M. 2012. Altered human CYP3A4 activity caused by Antley-Bixler syndrome-related variants of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase measured in a robust in vitro system. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 40: 754-760.
- Mulder, G. J. e Scholtens, E. 1978. The availability of inorganic sulphate in blood for sulphate conjugation of drugs in rat liver in vivo. (35S)Sulphate incorporation into harmol sulphate. *The Biochemical journal* 172: 247-251.
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C. e Nebert, D. W. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6: 1-42.
- Neuwald, A. F., Krishnan, B. R., Brikun, I., Kulakauskas, S., Suziedelis, K., Tomcsanyi, T., Leyh, T. S. e Berg, D. E. 1992. cysQ, a gene needed for cysteine synthesis in *Escherichia coli* K-12 only during aerobic growth. *Journal of bacteriology* 174: 415-425.
- Nowell, S. e Falany, C. N. 2006. Pharmacogenetics of human cytosolic sulfotransferases. *Oncogene* 25: 1673-1678.
- Omary, M. B. 2004. Intermediate Filament Cytoskeleton. Elsevier Inc., California.
- Omura, T. e Sato, R. 1964. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties. *The Journal of biological chemistry* 239: 2379-2385.
- Pani, A., Loi, A. G., Mura, M., Marceddu, T., La Colla, P. e Marongiu, M. E. 2002. Targeting HIV: old and new players. *Current drug targets. Infectious disorders* 2: 17-32.
- Park, B. K., Kitteringham, N. R., Maggs, J. L., Pirmohamed, M. e Williams, D. P. 2005. The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology* 45: 177-202.
- Parkinson, A. 2001. Biotransformation of Xenobiotics. *In* Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons (C. D. Klaassen, eds), 5a ed., pp 133-124, McGraw-Hill, Inc., Kansas
- Paulson, G. D., Caldwell, J., Hutson, D. H. e Menn, J. J. 1986. Conjugation Mechanisms of Xenobiotic Metabolism: Mammalian Aspects. *In* Xenobiotic Conjugation Chemistry (J. Caldwell, eds), pp 2-28, American Chemical Society, London.
- Pollard, R. B., Robinson, P. e Dransfield, K. 1998. Safety profile of nevirapine, a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor for the treatment of human immunodeficiency virus infection. *Clinical therapeutics* 20: 1071-1092.
- Pollard, V. W. e Malim, M. H. 1998. The HIV-1 Rev protein. *Annual review of microbiology* 52: 491-532.
- Powles, T., Robinson, D., Stebbing, J., Shamash, J., Nelson, M., Gazzard, B., Mandelia, S., Moller, H. e Bower, M. 2009. Highly active antiretroviral therapy and the incidence of non-AIDS-defining cancers in people with HIV infection. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27: 884-890.

- Pumford, N. R. e Halmes, N. C. 1997. Protein targets of xenobiotic reactive intermediates. *Annual review of pharmacology and toxicology* 37: 91-117.
- Rendic, S. e Guengerich, F. P. 2012. Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism. *Chemical research in toxicology* 25: 1316-1383.
- Renosto, F., Martin, R. L. e Segel, I. H. 1987. ATP sulfurylase from *Penicillium chrysogenum*. Molecular basis of the sigmoidal velocity curves induced by sulfhydryl group modification. *The Journal of biological chemistry* 262: 16279-16288.
- Rens Domiano, S. S. e Roth, J. A. 1987. Inhibition of M and P phenol sulfotransferase by analogues of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate. *J. Neurochem* 48: 1411-1415.
- Robbins, P. W. e Lipmann, F. 1958. Enzymatic synthesis of adenosine-5'-phosphosulfate. *The Journal of biological chemistry* 233: 686-690.
- Ryser, H. J. e Fluckiger, R. 2005. Progress in targeting HIV-1 entry. *Drug discovery today* 10: 1085-1094.
- Shanabruch, W. G. e Walker, G. C. 1980. Localization of the plasmid (pKM101) gene(s) involved in *recA+lexA+*-dependent mutagenesis. *Molecular & general genetics* : MGG 179: 289-297.
- Shen, A. L. e Kasper, C. B. 1993. *In Handbook of Experimental Pharmacology* (J. B. e. G. Schenkman, H., eds), 1ª ed., pp 35-58, Springer-Verlag Inc., New York.
- Shenton, J. M., Popovic, M., Chen, J., Masson, M. J. e Uetrecht, J. P. 2005. Evidence of an immune-mediated mechanism for an idiosyncratic nevirapine-induced reaction in the female Brown Norway rat. *Chemical research in toxicology* 18: 1799-1813.
- Shenton, J. M., Teranishi, M., Abu-Asab, M. S., Yager, J. A. e Uetrecht, J. P. 2003. Characterization of a potential animal model of an idiosyncratic drug reaction: nevirapine-induced skin rash in the rat. *Chemical research in toxicology* 16: 1078-1089.
- Siegel, L. M. 1975. Metabolism of sulfur compounds. *In Metabolic Pathways* (D. M. Greenberg, eds), 3a ed., pp 217-286, Academic Press Inc., New York.
- Silverman, R. B. 2004. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*. Elsevier Academic Press, London.
- Timbrell, J. A. 1991. *Principles of Biochemical Toxicology*. Taylor & Francis Ltd., London.
- Torchin, C. D., McNeilly, P. J., Kapetanovic, I. M., Strong, J. M. e Kupferberg, H. J. 1996. Stereoselective metabolism of a new anticonvulsant drug candidate, losigamone, by human liver microsomes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 24: 1002-1008.
- Vermeulen, N. P. E. 1996. Role of metabolism in chemical toxicity. *In Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects* (C. Ioannides, eds), 1a ed., pp 29-53, CRC Press LLC, Boca Raton FL.
- Vermilion, J. L. e Coon, M. J. 1978a. Identification of the high and low potential flavins of liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. *The Journal of biological chemistry* 253: 8812-8819.

- Vermilion, J. L. e Coon, M. J. 1978b. Purified liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. Spectral characterization of oxidation-reduction states. *The Journal of biological chemistry* 253: 2694-2704.
- Werck-Reichhart, D. e Feyereisen, R. 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome biology* 1: REVIEWS3003.
- Wiseman, R. W., Fennell, T. R., Miller, J. A. e Miller, E. C. 1985. Further characterization of DNA adducts formed by electrophilic esters of the hepatocarcinogens 1'-hydroxysafrole and 1'-hydroxyestragole in vitro and in mouse liver in vivo, including new adducts at C-8 and N-7 of guanine residues. *Cancer research* 45: 3096-3105.
- Zhou, S., Chan, E., Duan, W., Huang, M. e Chen, Y. Z. 2005. Drug bioactivation, covalent binding to target proteins and toxicity relevance. *Drug metabolism reviews* 37: 41-213.

VI Anexos

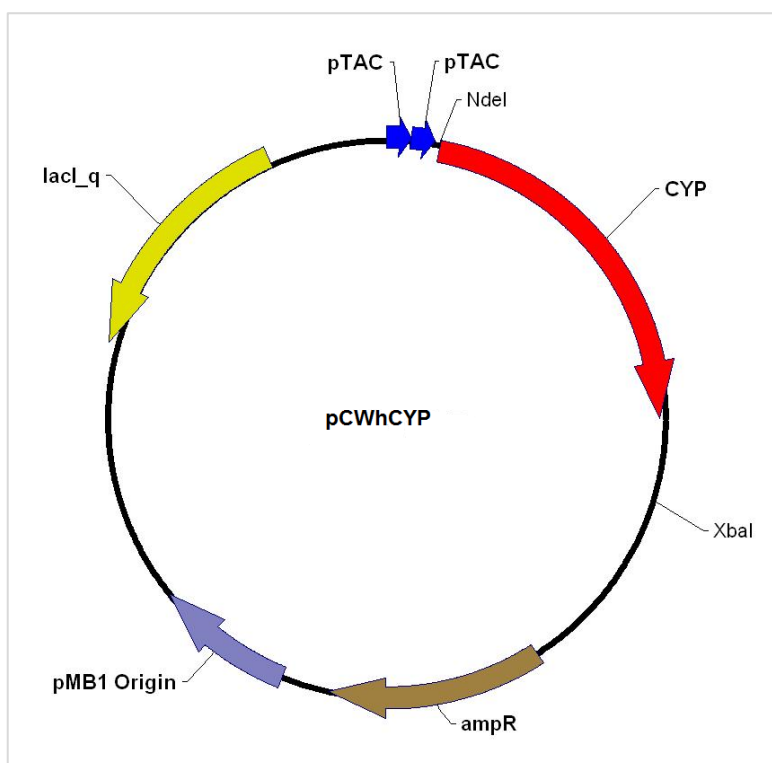


Figura VI.1 – Representação esquemática do plasmídeo pCWhCYP, portador do gene que codifica para várias isoformas de CYP humano, sob indução do promotor *ptac.ptac*, e do gene codificante do repressor *LacI^q*.

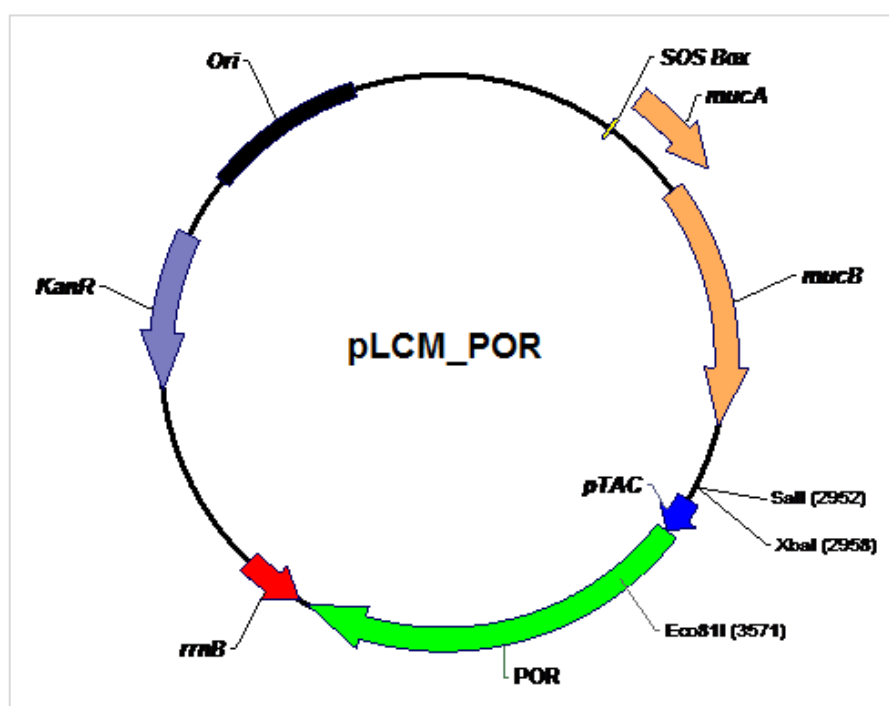


Figura VI.2 - Representação esquemática do plasmídeo pLCM_POR (9079 pb), portador do gene codificante de CYPOR humano, sob indução do promotor *ptac*, e do operão *mucAB*.

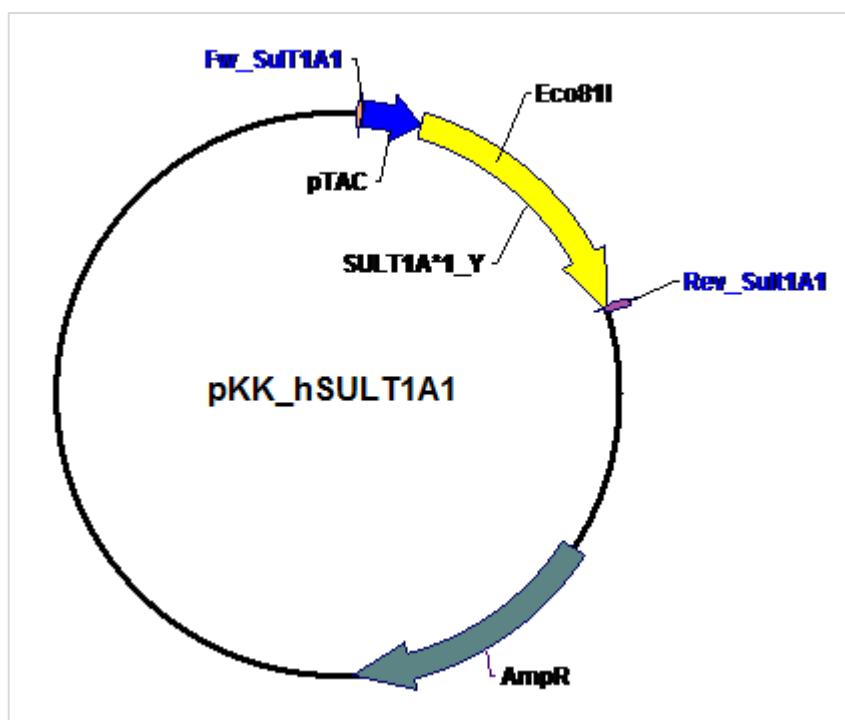


Figura VI.3 - Representação esquemática do plasmídeo pKK_hSULT1A1 (5750 pb), portador do gene codificante de SULT1A1 humano, sob indução do promotor ptac.

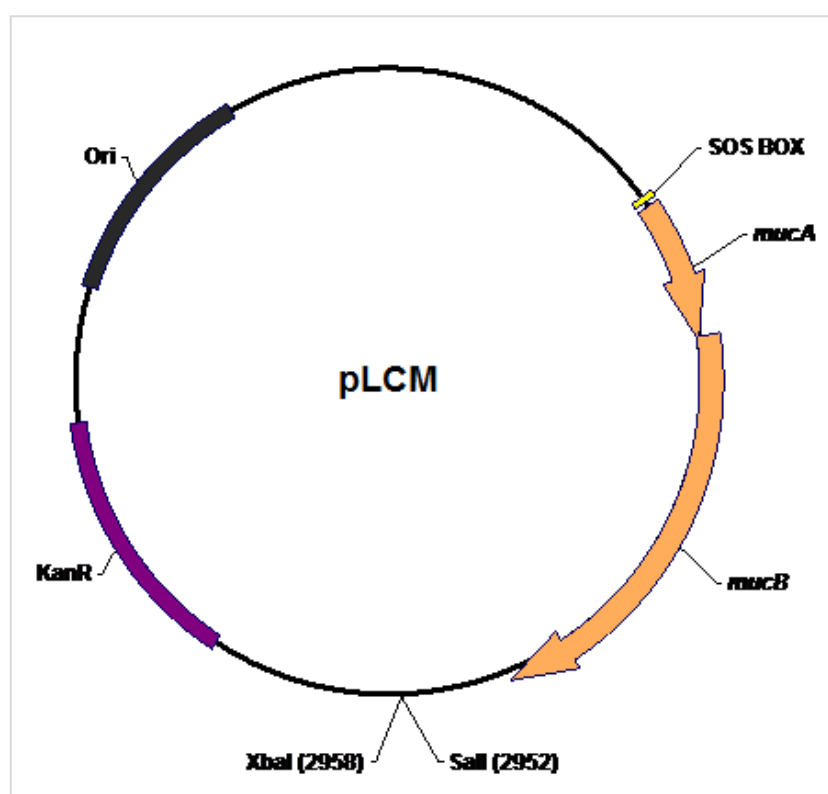


Figura VI.4- Representação esquemática do plasmídeo pLCM(5988 pb), portador do gene codificante do operão *mucAB*.

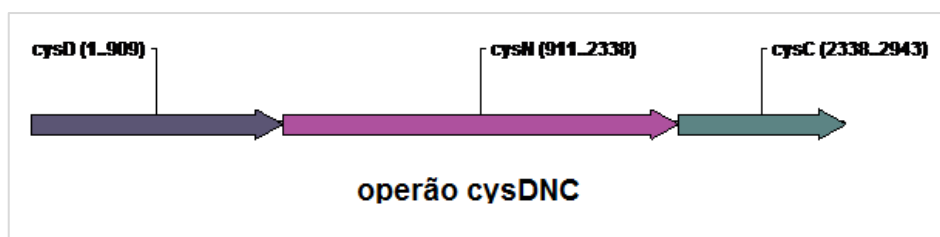


Figura VI.5 - Representação esquemática do operon *cysDNC* (2943 pb) de *E. coli*, codificante das enzimas ATP sulfurilase e APS cinase.



Figura VI.6 – Estruturas moleculares dos compostos padrão utilizados no decorrente estudo. (a) 1-MP, (b) 1-HMP e (c) FFA.